

Acta Haematologica

International Journal of Haematology · Journal International
d'Hématologie · Internationale Zeitschrift für Hämatologie

EDITORS-IN-CHIEF: H. LÖNN, Basel, und G. ROSENOW, New York

Organe Officiel de la Société Européenne d'Hématologie

CONTRIBUTING EDITORS:

A. ALDER, Aarau	J. GUANON, Barcelona	L. M. MEYER, Brooklyn, N.Y.
H. ALEXANDER, Santiago	J. HINGGILLER, Lausanne	J. MULDER, Leiden
O. BECKEL, Genève	J. VETTERLI, Vauderode	W. P. MICHOWSKI, Boston, Mass.
B. M. VON BOWENSTEIN Heidelberg	P. LITTON, Fribourg	E. NEUMANN, London
W. O. CHAZ, Rio de Janeiro	F. KOLLER, Zürich	N. G. NORDSTRÖM, Stockholm
C. R. DAS GUPTA, Calcutta	F. LANGE, Louvain	A. PAVLOVSKY, Buenos Aires
L. K. DRAMOND, Boston, Mass.	C. D. DE LANGE, Utrecht	E. FOSBERG, Mincola, N.Y.
C. JORDAN DIAZ, Madrid	J. H. LAWRENCE, Berkeley Calif.	F. REIMANN, Istanbul
H. DUBOIS-FERRELL, Genève	P. LEVICK, Radnor, N.J.	I. SHAPIRO, Brooklyn, N.Y.
P. FARRERAS, Barcelona	J. R. LEHMAN, Chicago, Ill.	E. STOWITZ, Modena
R. FENLEY, Leiden	W. LÖNN, Zürich	E. UHLMANN, Basel
A. FISCHER, Genève	J. MALLARD, Paris	M. VARELA, Buenos Aires
		A. VONERKE, København

EDITORS

L. Hellmeyer
Freiburg/Bz.

E. Meulengracht
København
J. Waldenström
Lund

S. Moeschlin
Basel

H. Lönn
Basel

EDITORS-IN-CHIEF

1965

BASEL (Schweiz)

J. BARBER

NEW YORK

ADAR, H. <i>vide</i> SADAN, N.	
AKSOY M. AND ERDEM, S. (Istanbul): The Thalassemia Syndromes. V Cooley' Anaemia with Low Level of Fetal Haemoglobin. A Genetic Study in Four Families	291
ALA, F. A. AND SERRAVALLO, D. J. C. (Edinburgh) A Case of Autoimmune Haemolytic Anaemia, Thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré Syndrome	361
ANDERSEN, S. B. (Copenhagen): Metabolism of γ G-Globulin in Chronic Leukaemia	44
ANTONOGILI, J. A., BAKER, A. ET VANDUTTI, A. (Lainio) Les phosphatases leucocytaires alcalines et acides. Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques	129
ARGAROV, A.: <i>vide</i> OKGODLU, A.	
BACHMANN, F.: <i>vide</i> FROCK, P. G.	
BAKER, A.: <i>vide</i> ANTONOGILI, J. A.	
BELFIORE, F., MELDOLINI, J. AND CALGARA, G. (Ostia): Erythrocyte Enzymes in Thalassemia and Thalassemoiderythropoiesis	329
BELL, W. N. <i>vide</i> THOMPSON, R. B.	
BECANOVÁ, J.: <i>vide</i> BRANEČ, V.	
BRANEČ, V., BECANOVÁ, J., FREIDMAN, B., KOUT, M., MÍROŠOVÁ, L., PALER, J., VOJATOVÁ, M. UND VOLKE, V. (Praag) Stoffwechselveränderungen in Erythrozyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit	86
BRUNGER, H. E. (Zürich): Die Orthomyelofibrose. Untersuchung der Ferro- und Erythrozytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom	257
BURGESS, W. <i>vide</i> KLEBER, N.	
BURCARDE, L. <i>vide</i> INTERRICCI, P.	
CALGARA, G. <i>vide</i> BELFIORE, F.	
CARRARA, P. M. <i>vide</i> POWRI, G. B.	
CATALDO, F. DE (Milano) Acquired Idiopathic Hypoprothrombinaemia. Acquired Hypoprothrombinaemia Secondary to Selective Deficient Absorption of Vitamin K	167
CLOTTER, R.: <i>vide</i> HEILMEYER, L.	
CLOTTER, R. <i>vide</i> HEIMPEL, H.	
OKGODLU, A.: <i>vide</i> GURKAN, F.	
CHENKAT, L. <i>vide</i> RÁK, K.	
EFRATI, P. <i>vide</i> SADAN, N.	
ECKERT, J. L. <i>vide</i> KALPANTHOLOU, PIERA, K.	
ERDEM, S. <i>vide</i> AKSOY M.	
FRIDMAN, B. <i>vide</i> POWRI, G. B.	
FORMIS, PH. AND PAPAYANNOPOULOU, TH. (Athens) Cytocchemical Observations on β -Thalassemia. I. The PAS Positive Substance of Erythroblasts	1
FROCK, P. G., BACHMANN, F. UND SCHMID, J. R. (Zürich) Eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorase-mangels	215
FREIDMAN, B. <i>vide</i> BRANEČ, V.	
GARCONE, A. UND RIBONERO, F. (Zürich) Hämolytische Krise bei Mangel an Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und Bilirobinurikation	536

GOMEL, P	vide RONDANELLI, E. G.	
GOTZ, H.	vide SCHIEFFARTH, F.	
GRAMLICH, F	vide MÜLLER, H. E.	
GRIGNANI, F ; MARTELLI, M.; TORATO, M. AND COLENOVA, A. (Portugal)	Studies on the Tetrahydrofolic Acid Dependent Enzyme System in Human Leukocytes	72
HARMS, D AND SACHS, H. (Kiel)	Familial Chronic Thrombocytopenia with Platelet Autoantibodies	30
HEILMEYER, L. UND CLOTTEN, R. (Freiburg im Br.)	Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Guntherischen Porphyria congenita	63
HEILMEYER, L.	vide HEIMPEL, H.	
HEIMPEL, H. CLOTTEN, R. UND HEILMEYER, L. (Freiburg im Br.)	Untersuchungen über die Häm-Synthese in roten Blutzellen	193
HOOBMAN, A.	vide ROBINSON, E.	
HUNTER, H. LEWIS, S. M. UND STUE, L. (Linsbuck/London)	Die Indifikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrozytenmenge bei Polycythemia vera und Polytglobulien	116
INTROZZI, P. BORGARDI, L. ET NOTARIO, ANTONIA (Pavia)	Alterazioni erythroblastiques et erythrocytaires dans la myelose erythro-mique aigue	277
KALFAKTHOPOULOS, PITA, K. AND EMERY J. L. (Athens)	HUMAN BONE MARROW During the Last Three Months of Intrauterine Life	228
KLEINE, N. UND BORGARD, W. (Freiburg im Br.)	Die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrozyten im niederfrequenten Bereich	51
KLEIN, D.	vide SCHUBOTER, H.	
KOUT M.	vide BRAHEG, V.	
KREIDA, F.	vide RÄK, K.	
LEWIS, S. M.	vide HUNTER, H.	
LOTZ, H.	vide SCHIEFFARTH, F.	
MAGGIULO, E.	vide RONDANELLI, E. G.	
MARTELLI, M.	vide GRIGNANI, F.	
MELDOLINI, J.	vide BELFIORE, F.	
MESEKON, VIRGINIA	vide OKPODOLU, A.	
MINŠTEVOVÁ, L.	vide BRAHEG, V.	
MÜLLER, H. E. UND GRAMLICH, F. (Mainz)	Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrozyten	259
NOTARIO, ANTONIA.	vide INTROZZI, P.	
ODUM, J.	vide THOMPSON, R. B.	
OKPODOLU, A. MESEKON, VIRGINIA AND ARGABOV, A. (Ankara)	A Further Example of Thalassemia-Hemoglobin E Disease in Turkey	354
PALEK, J.	vide BRAHEG, V.	
PAP YAKHOPOULOS, TH.	vide PERAS, PZ.	
PORTI, G. B.; VALENTINI, R. CIARRARA, P. M. AND KRIDANI, S. (Milan)	Investigations on the Cholinergic Complement in Some Myeloproliferative Disorders	36
RAJU, S.	vide SCHUBOTER, H.	
RÄK, K. KREIDA, F ; VAMDA, L. UND OBERHAY, I. (Szeged)	Untersuchung der Thrombocytopoese bei Perniklose-Krankheit	175
RAU, F. J.	vide THOMPSON, R. B.	

REWALD, E. AND SCHWAB, F. (Afar del Plata) Substitutive-Inhibitory Gamma Globulin Therapy as Prevention of Still- birth in Rh-Incompatibility	209
ROSENBERG, F.: vide GAZDAR, A.	
ROBINSON, E. AND HOCHMAN, A. (Jerusalem): The Effect of Typhoid Vaccine Injection of Partial Body Irradiated Rats	301
RODMANELL, E. G.; GORDI, P. AND MAGLIELLO, E. (Paria) Chloramphenicol and Erythropoiesis	321
ROZENBLAJN, L.: vide SADAN, N.	
SACHS, H.: vide HADAR, D.	
SADAN, N.; YAFFE, D.; ROZENBLAJN, L. ADAR, H.; SOROSKER, B. AND EFRATI, P. (Haifa/ Rehovoth) Cytochemical and Genetic Studies in Four Cases of Chediak-Higashi-Stein- brink Syndrome	20
SCHIFFARTH, F.; GÖTZE, H. UND LUTZ, H. (Erlangen) Zur Charakterisierung von Myelomproteinen und Makroglobulinen	144
SCHÖD, J. R. vide FRICK, F. G.	
SCHWOTKE, H. RAJU, S. UND KURIM, D. (Freiburg im Br.): Untersuchungen über kälte stabile und wasser stabile Serumkomponenten bei Paraproteinkämien und Dysproteinkämien	160
SHEARMAN, D. J. C. vide ALA, F. A.	
SCHWARTZ, B. vide SADAN, N.	
SCHWAB, F. vide REWALD, E.	
SEITZ, L. vide HUBER, H.	
THOMPSON, R. B.; RAY, P. J.; ODUM, J. AND BELL, W. N. (Jackson, Miss.): The Sickling Phenomenon in a White Male Without Hb-S	347
TURATO, M. vide GREGORI, F.	
VALENTINI, R. vide POTTE, G. B.	
VANNOTTI, A.: vide ANTONELLI, J. A.	
VARGA, L. vide RÁK, E.	
VOLET, V.: vide BRANCO, V.	
VORASOVA, M. vide BRANCO, V.	
VERKER, R. A. DE (Louvain) A Technique for Routine Evaluation of Plasminogen in Humans During Streptokinase Therapy	305
WINDIG, H. (Berlin) Description of Some Toxic Heavy Metals from Human Erythrocytes in vivo	101
YAFFE, D. vide SADAN, N.	
NECROLOGIA	571
LIBRI	127 250
VARIA	64 128 570
SUMMARI 16, 27 33, 42, 49 62, 70, 85, 98, 114 124, 140, 156, 173, 185, 191 206, 213, 223, 236	247 274 289, 296, 304 318, 327 334, 343, 352, 358, 367
INDEX RERUM ad Vol. 34	372
INDEX AUTORUM ad Vol. 34	379

All rights, including that of translation into foreign languages, reserved.
Photomechanical reproduction (photocopy, microcopy) of this book or part of it without special
permission of the publishers is prohibited



Copyright 1965 by S. Karger AG, Basel
Printed in Switzerland by Buchdruckerei Argenter Tagblatt AG, Aarau
Chicago: Switzer & Co AG, Basel

From the Department of Clinical Therapeutics, University of Athens,
School of Medicine, Athens (Dir. Prof. B. Malamou)

Cytochemical Observations on β Thalassemia

I The PAS Positive Substance of Erythroblasts

By PHAEDON FESSAS AND THALIA PAPAYANNPOULOU

By the application of cytochemical methods three major abnormalities have been demonstrated in the erythroblasts and to a smaller extent in the erythrocytes of thalassemia: 1) the deposition of large amounts of iron containing material (1); 2) the accumulation of a PAS** positive substance (2, 3); 3) the presence of haemoglobin precipitates (4). It is now widely accepted (5) that typical thalassemia is due to an inherited inability to synthesize sufficient β -chains of the normal adult haemoglobin molecule. Of the above cytochemical abnormalities, the first and the last are directly related to this defect of haemoglobin synthesis. Deposition of excess iron is a phenomenon not unique for thalassemia: it occurs in many conditions in which haemoglobin synthesis is impaired at various levels owing to genetic or non-genetic causes (6). As for the haemoglobin precipitates, they have been considered as being formed by α -chains which have remained uncombined because of the shortage of the complementary β -chains (4, 7); again, this is not a unique situation and an excess of β -, γ - and δ -chains is observed in the α -chain thalassemias (8).

The presence of a PAS positive substance however cannot be interpreted so easily. Obviously our concepts on thalassemia will remain incomplete – and may even need revision – in case this major cytochemical abnormality cannot be integrated rationally into the accepted scheme of pathophysiology of this disease. For this reason we thought it necessary to reexamine the question of

Supported by Grant No. HE-04541 of the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service.

PAS = Periodic Acid Schiff

the PAS positive material in thalassaemic erythroblasts, the more so because the first description of this abnormality antedates the newer findings on thalassaemia.

Material and Methods

The study was carried out on freshly prepared blood and bone marrow smears of β -thalassaemia homozygotes, β -thalassaemia combinations with haemoglobin S E and Pylon and on bone marrow smears from cases with β -thalassaemia trait. One case of homozygous Hb S disease and one case of haemoglobinopathy H were also studied. For comparison sake patients with iron deficiency anaemia, other haematological disorders and some normal newborns were included.

The diagnosis was established in each case by the application of all methods currently applied in this laboratory for the study of thalassaemia and haemoglobinopathies. Therefore only the cytochemical techniques will be given in detail.

PAS reaction (St.) Preparation of substrates. 1. The solution of periodic acid (Periodic acid cryst. FLUKA), 1 in distilled water was prepared just prior to use; 2. Reducing bath: 6 ml of a 10^{-2} aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was mixed with 5 ml of 1 N HCl and made up to 100 ml with distilled water: this was prepared immediately before use. 3. Schiff's reagent: 1 gr of basic fuchsin (fuchsin-Para C. I. 676, HARLECO) was dissolved in 200 ml of boiling distilled water. The solution was cooled to 50° and filtered. Twenty ml of 1 N HCl were added to the filtrate. The solution was cooled to 25°C , 1 gr of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was added and was kept in the dark for 14 or 24 hours at room temperature. Two grams of activated charcoal were then added to the solution, which was shaken for 2 minutes and filtered. The filtrate was kept in the dark at 0 to 4°C . It was allowed to reach room temperature before being used. **Procedure:** Air dried smears were fixed in absolute methanol for 10 minutes and rinsed in distilled water. They were then treated: a) in the periodic acid solution for 8 to 10 min and rinsed in distilled water; b) in reducing bath for 1 min, rinse in distilled water; c) in Schiff's reagent for 30 min and rinsed in distilled water; d) in running tap water for several minutes; e) for counterstaining in Harris Haematoxylin for 10 min, rinse in tap water. The success of the stain was judged from the intensity of staining in the white blood cells. As a rule at least 500 erythroblasts from bone marrow or blood were inspected for PAS-positivity: the results have been expressed as percent of PAS positive erythroblasts. In only exceptional cases fewer cells were counted, because of the low proportion of normoblasts in the periphery. **Diasase digestion.** Smears fixed in absolute methanol, as above were treated in 0.1% solution of diastase (Merck malt diastase or pure diastase) in normal saline, for one hour at room temperature. Human saliva, as source of diastase, was also tested. Control slides, fixed in methanol, were treated with normal saline and incubated for one hour.

Methylgreen-Pyronin stain. The staining solutions were prepared as recommended by ALTMAN (9b): 1. 2% aqueous solution of Pyronin G (BDH) and 2. aqueous solution of Methyl-Green (HARLECO) are extracted separately with CHCl_3 until the CHCl_3 layer becomes colourless. The working solution is made by mixing 12.5 ml of the purified solution of Pyronin G and 7.5 ml of the solution of Methyl-Green with 15 ml of distilled water. In some experiments Pappenheim-Saathof stain (HARLECO) was used. **Procedure:** 1. Brief fixation of slides by Carnoy fluid. 2. immersion in the Methylgreen-Pyronin solution for 10 min. 3. rinse in running tap water. **Ribonuclease digestion.** Smears, fixed briefly in Carnoy fluid, are incubated in solution of crystalline ribonuclease BDH (0.5 mg/ml in glass distilled water for one hour at 37°C . After washing in running water the slides are stained by the Methylgreen-Pyronin method.

Alcian Blue (70). The smears are fixed in neutral formalin or in Carnoy fluid and stained in freshly filtered solution of Alcian Blue 8 G S, 0.15 gm in 3% acetic acid.



Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1 Case No. 5, table I blood. A strongly PAS-positive polychromatophilic normoblast and two PAS-negative cells with pyknotic nuclei. PAS stain with haematoxylin counterstain.

Fig. 2 Case No. 6, table I blood. A strongly PAS-positive cell in the center with dense PAS-positive granules surrounding the haemoglobinase inclusion body and the nucleus. Another normoblast with inclusion (left) and one without inclusion are PAS-negative.

for about 20 min. After rinsing in distilled water the slides are briefly rinsed in 1% acetic acid and then rinsed again in distilled water. Neutral red or Safranin O is then used for nuclear counterstain. Touch preparations from freshly obtained pieces of umbilical cord were used as positive controls.

Prussian Blue stain. The smears were stained for haemosiderin by the method of RATH AND FINCH (11).

Baccharin stain. This stain was applied according to LARSEN (12).

Methyl Violet stain. This was applied as a vital stain for the demonstration of haemoglobinase inclusion bodies on venous blood or bone marrow aspirates, collected in ACD from cases of Cooley's anaemia, as described previously (4).

Results

Morphology

The morphological features of the PAS-positivity in thalassaemic normoblasts are shown in the accompanying figures 1-6. We would like to emphasize the intensity of staining, often stronger than the PAS-positive substance of granulocytes, and the preponderantly coarse granular appearance. There is some variation in the arrangement of these granules, which may cover densely the entire cytoplasm or may be placed only at the periphery and in

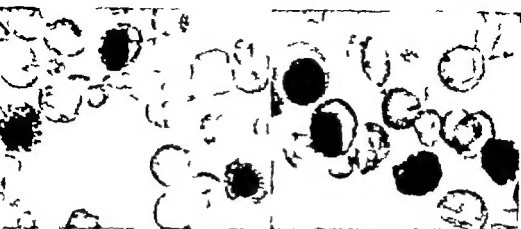


Fig 3

Fig 4

Fig 3 Case No. 8, table II, blood. A strongly PAS-positive normoblast at left, faintly positive one at right and negative one in the upper center.

Fig 4 Case No. 9, table II, blood. Faint, diffuse PAS-positive material surrounding the large inclusion body and in the cytoplasmic rim in the normoblast at left. The cell in the center is moderately positive while the one at right is PAS-negative.

zones bridging the nucleus with the periphery. Diffuse staining was encountered only rarely, exclusively in late normoblasts (fig 4). PAS-positive red cells were also a rarity, even in cases with high percentages of positive normoblasts.

By successive staining for iron and polysaccharides it became evident that both cytochemical abnormalities may be present in one cell, however, the number of iron granules was smaller and their arrangement was clearly different. PAS positive cells may or may not contain iron granules and vice versa, the existence of a more subtle relationship between the occurrence of these two abnormalities is not necessarily excluded by these qualitative findings.

As concerns the haemoglobinisation of the PAS positive cells, studied after previous staining with benzidine, it was evident that most positive normoblasts had a very low haemoglobin content even when mature. The PAS-positive granules often appeared to be arranged in the same areas with haemoglobin, as on the rim of cytoplasm, in folds of the cellular membrane and in bridges connecting the nucleus to the periphery. In cases of normoblasts which had also an inclusion body, the PAS-positive granules were arranged around the inclusion (fig 2) which could be thus recognized easily when sufficiently large. PAS-positivity does not necessarily accompany the presence of an haemoglobinaemic inclusion, several cases



Fig. 5

Fig. 6

Fig. 5. Case No. 10, table II, blood. PAS-positive granules in the haemoglobinized areas of the cell at left, while the normoblast at right is negative.

Fig. 6. Numerous PAS-positive normoblasts and a non-enclosed cell (erythroblast fragment) in the blood of the case of Hb F₁₀ β -thalassaemia (table III, b case 2).

with a very high percentage of inclusion-carrying cells had few PAS-positive ones, but the two abnormalities are by no means mutually exclusive. The inability to visualize smaller or less dense inclusions, because the methyl violet stain disappears during the PAS staining procedure precludes a precise quantitative evaluation of the interrelation of the two abnormalities.

The PAS-positive cells are mainly polychromatophilic and orthochromatic normoblasts, but, judging from the appearance of the nucleus, the analogy of PAS-positive cells at the polychromatophilic stage appears to be higher at least in the bone marrow. Basophilic erythroblasts very rarely display PAS-positivity; the phenomenon appears also rather rarely in very pyknotic, over-mature normoblasts. The exact distribution of PAS-positive cells according to age was hampered by the difficulty in defining the degree of cytoplasmic maturation on smears treated with the PAS-reagent and counterstained with a nuclear counterstain.

Qualitative Study

The smears from 6 cases with pronounced PAS-positivity were subjected to digestion with maltdiastase or purified diastase. The

results have been, on repeated testing uniform with both preparations and consisted in disappearance of the PAS positivity of the normoblasts and of the white cells. Control smears immersed for the same period of time and at the same temperature in saline displayed no change in PAS positivity so that the difference between control smears and diastase treated smears was indeed striking. In view of the specificity of the diastase digestion it is concluded that the positive PAS reaction is due to the presence of glycogen.

Treating of the smears with saliva did also cause constant reduction of PAS-positivity which, however was sometimes less complete than with the enzyme preparations. Smears prepared two years prior to testing which had been unfixed and unstained displayed resistance to the digestion of the PAS-positive material of both normoblasts and white cells.

By pyronin methyl green staining it became evident that there was no connection between pyroninophilia and PAS-positivity. About 90% of the pyroninophilic normoblasts were judged to be either basophilic or polychromatophilic. The pyroninophilic material differed in appearance from the PAS positive granules: it was more finely granular usually with delicate bridges connecting these granules. The haemoglobinaemic inclusion bodies were pyronin-negative. Following digestion with ribonuclease performed with appropriate controls, the pyroninophilia disappeared whereas PAS positivity could be still demonstrated, unaltered. Thus, we did not confirm the ribonuclease resistant pyroninophilia described by ARALDI et al. (2) for the PAS positive granules.

By staining with Alcian blue, no positive staining could be seen in any normoblasts of highly PAS positive cases. This would exclude the presence of an acid mucopolysaccharide, for which this stain is specific (10).

Occurrence

β -Thalassaemia The detailed results are given on tables I and II. It should be stated that the material is markedly heterogeneous as concerns age of patients, severity of condition, previous transfusions and frequency of transfusions, previous splenectomy and degree of anaemia. The genetic constitution is also variable: unfortunately it could not be established in all cases, especially older patients. On the tables only the degree of anaemia and the overall

Table I
Thalassaemia major PAS-positive erythroblasts in bone marrow and blood.

Case No.	Sex	Age	Hb	Erythroblasts per 100 WBC	Hb F	Clinical Severity	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Erythroblasts PAS (+) % Bone marrow	Blood
1	M	1 year	9.1	14	44	Severe	—	+	12.8	3.0
2 ^a	M	14 months	5.6	96	33	Severe	—	+	30.8	4.0
3	F	1½ months	6.0	24	8	Severe	—	+	7.0	4.0
4 ^a	M	3 years	9.0	Very rare	60	Severe	—	+	29.0	
5 ^a	M	3 years	7.4	100	26	Severe	—	+	22.5	23.0
6 ^a	M	3.5 years	4.8	332	48	Severe	+	—	19.0	7.6
7 ^a	M	4 years	5.0	7	98	Severe	—	—	15.8	
8 ^a	F	5 years	4.5	9	38	Severe	—	—	19.4	15.0
9 ^a	F	5 years	6.6	184	62	Severe	—	—	27.0	21.4
10 ^a	F	6 years	5.6	332	72	Severe	—	—	20.8	21.0
11	F	6 years	7.2	Very rare	40	Severe	—	+	23.0	
12 ^a	M	7 years	9.1	1	63	Intermed.	—	—	7.4	
13 ^a	M	8 years	6.4	Very rare	60	Severe	—	+	29.4	
14 ^a	F	22 years	6.6	Very rare	7.5	Intermed.	—	+	3.4	
15 ^a	F	26 years	7.6	5	98	Intermed.	—	—	0.2	
16 ^a	M	28 years	10.2	32	70	Intermed.	—	—	11.0	1.0
17 ^a	F	28 years	6.0	—	11	Intermed.	—	+	0.1	
18 ^a	M	31 years	2.2 ^a	1	53	Intermed.	—	—	7.2	
19 ^a	F	32 years	6.6	9	7.8	Intermed.	—	+	0.0	
20 ^a	F	35 years	4.3 ^a	1	47.9	Intermed.	—	—	8.0	
21	M	40 years	6.7	1	32	Intermed.	—	—	4.0	
22 ^a	M	60 years	6.8	6	6	Intermed.	—	—	0.17	

No figures given because of the very small number of circulating normoblasts.

Both parents with A_2 thalassaemic trait.

Either one or both parents not available for study. I All instances examined the one parent or sibling had high A_2 thalassaemic trait.

Combination of high A_2 with high F type of thalassaemic trait.

Megaloblastic bone marrow at the time of study.

severity of the condition, as judged from need for transfusions, extent of bone changes and impairment of growth, are indicated. Levels of Hb F are also given, though they are not very meaningful in patients recently transfused.

PAS-positive normoblasts were observed in all cases, but as can be seen on the tables, there is a great variation in the percentage of positive normoblasts. In several cases (table I, No 15 17 19 and 22) the positive cells in the bone marrow were so few as to be practically absent. Whenever specimens of bone marrow and blood were taken on the same date the percentage of PAS-positive cells was usually higher in the bone marrow. In few cases the proportions were equal but in no case was the percentage much higher in the

Table II
Thalassemia major PAS-positive erythroblasts in blood.

Case No.	Sex	Age	Hb g	Erythroblasts per 100 WBC	Hb F %	Clinical severity	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Normoblasts PAS (+)
1	M	6 months	7.9	12	79.5	Severe	—	—	4.0
2 ¹	M	4 months	6.7	30	85.0	Severe	—	—	29.6
3 ¹	M	6 months	7.2	15	66.6	Severe	—	—	7.0
4 ¹	M	2 years	5.5	14	98.0	—	—	—	4.0
5 ¹	M	3 years	4.9	11	35.0	Severe	—	+	35.0
6 ¹	M	4 years	7.3	38	98.0	Intermed.	—	—	6.4
7 ¹	M	4 years	7.2	5	38.0	Severe	—	+	8.0
8 ¹	F	4 years	7.5	40	75.0	Severe	—	—	8.4
9 ¹	F	4 years	7.8	219	50.0	Severe	+	+	8.6
10 ¹	F	5 years	9.4	36	58.0	Severe	—	—	8.0
11 ¹	M	3 years	2.9	42	85.0	Severe	—	—	3.4
12 ¹	M	3 years	9.6	40	10.7	Severe	+	+	1.0
13 ¹	M	3 years	5.2	61	24.0	Severe	+	+	5.6
14 ¹	F	3 years	8.4	360	30.0	1 termid.	+	+	0.4
15 ¹	M	7 years	9.4	11	27.0	Severe	—	+	24.6
16 ¹	F	8 years	7.0	40	19.0	1 termid.	—	+	2.4
17 ¹	M	8 years	5.6	205	—	Severe	+	+	10.2
18 ¹	F	9 years	7.0	802	43.0	Intermed.	+	+	1.2
19 ¹	F	9 years	7.5	450	98.0	1 termid.	+	—	1.2
20 ¹	F	9 years	4.8	398	73.0	Severe	—	—	42.0
21 ¹	F	9 years	7.9	16	35.0	Severe	—	+	8.0
22 ¹	F	10 years	4.8	196	32.5	Intermed.	+	—	2.0
23 ¹	F	12 years	7.2	630	—	1 termid.	+	+	4.2
24 ¹	M	12 years	6.9	12	15.2	Intermed.	+	+	3.0
25 ¹	M	13 years	5.9	146	34.0	Intermed.	+	+	1.4
26 ¹	F	15 years	8.5	111	98.0	Severe	+	—	3.8
27 ¹	F	15 years	8.2	693	—	Intermed.	+	+	1.0
28 ¹	F	16 years	5.0	802	52.0	Severe	—	—	1.2
29 ¹	F	20 years	7.2	264	11.7	Intermed.	+	—	1.0
30 ¹	M	28 years	8.7	110	7.8	Intermed.	+	—	0.1
III	M	31 years	6.3	298	26.0	Intermed.	+	—	1.6

Both parents with high A_0 thalassemia trait.

Either one or both parents not available for study I all instances examined the one parent or sibling had high A_0 thalassemia trait.

blood than in the bone marrow. When the proportion of PAS positive normoblasts in the periphery is low, no accurate deductions can be drawn concerning the situation in the bone marrow.

Splenectomy, though causing always a striking increase of the number of circulating normoblasts, was not associated with a higher degree of PAS positivity, if anything the percentages of PAS-positive cells in the periphery are lower in splenectomized patients.

These lower percentages may be connected with the constitution of the erythroblastic population following splenectomy after which the very mature pyknotic erythroblasts preponderate in the periphery.

Correlation with the levels of Hb F is practically absent: cases presenting exclusively or almost exclusively Hb F are among those with very low PAS positivity. Low degrees of positivity were also encountered in non transfused patients with low percentages of Hb F. The effects of transfusion on the degree of PAS positivity have not been evaluated.

A rough correlation can be seen between the degree of PAS positivity with the age of the patient or with the overall severity of the patient's condition. High degrees of PAS positivity are exceptional in cases beyond the first decade of life and were not seen in the cases characterized as intermediate. Intensively stained PAS positive normoblasts were observed in infants with thalassaemia major aged 6 months or less (cases 1, 2 and 3, table II) and the abnormality could be detected, fully expressed, at birth, in infants in which the diagnosis was made at that time and corroborated again later (to be published).

Double heterozygotes for β -thalassaemia and haemoglobin variants
The results are shown on table III. The degree of PAS positivity in the blood and bone marrow of microdrepanocytic patients is low with only one notable exception (case 2, table III). In β -thalassaemia/Hb Fylos double heterozygotes one patient displayed one of the highest degrees of positivity of the whole series (fig. 6) while in his brother the findings were unimpressive: the latter was in a better general condition. The findings in Hb E/ β -thalassaemia were not impressive.

Thalassaemia trait. The bone marrow of 10 adults was examined, with entirely negative findings. However in some newborns later shown to have the trait, up to 12% positive normoblasts were seen: the intensity of staining was clearly and constantly weaker than observed in thalassaemia major.

Other haemoglobinopathies. The findings were negative in one case of homozygous Hb S disease; only 2 weakly stained positive cells among 600 were seen in the case of haemoglobinopathy H on which bone marrow was obtained.

Other anaemias. Weakly to moderately positive findings were obtained in the bone marrow in 6 out of 9 patients with iron deficiency anaemia. The degree of positivity

Table III

Case No.	Age	Sex	Hb g %	Ht F %	Erythroblasts per 100 WBC	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Normoblasts PAS (+) % Bone marrow	Blood
<i>a) Haemoglobin S/β-thalassaemia</i>									
1	5	F	7.6	7.8	0	—	+	1.3	
2	7	F	10.0	5.0	0	—	+	24.5	
3	8	M	3.7	2.0	120	—	—	6.8	7.0
4	10	F	6.0	10.0	0	—	—	0.0	
5	24	M	9.1	17.5	116	—	—		2.5
6	26	F	11.0	27.7	1	—	—	0.2	
7	27	F	3.9	22.0	182	—	+		0.85
8	32	F	7.2	10.2	58	+	+		0.0
<i>b) Haemoglobin D/β-thalassaemia</i>									
1	5	M	8.8	36.0	32	—	—		2.0
2	6	M	5.8	70.0	600	+	—		46.0
<i>c) Homozygous drepanocytic anaemia</i>									
1	13	F	9.6	5.8	very rare	—	—	0.0	
<i>d) Haemoglobin E/β-thalassaemia</i>									
1	15	F	7.9	25.0	190	+	+		0.4
<i>e) Haemoglobin H disease</i>									
1	40	F	7.9	2.0	0	—	—	0.32	
<i>f) Hypochromic anaemia (Serum iron 9 to 27 γ%)</i>									
1	16 mths	M	5.2	<2.0		—	—	14.0	
2	13	F	4.7	<2.0	very rare	—	—	16.0	
3	70	M	6.4	<2.0	0	—	—	1.8	
4	69	M	7.9	<2.0	0	—	—	0.0	
5	17	F	6.0	<2.0	0	—	—	5.0	
6	10	M	7.1	<2.0	0	—	—	3.0	
7	62	M	6.5	<2.0	0	—	—	3.2	
8	69	F	6.8	<2.0	0	—	—	0.0	
9	63	F	7.0	<2.0	0	—	—	0.0	

appeared to correlate somewhat with the degree of anaemia and serum iron levels (table III). PAS positive erythroblasts (22%) and erythrocytes (6%) were also found in one infant with acute erythroleukaemia and in one anaemic newborn with congenital syphilis (3% PAS positive erythroblasts). PAS positive erythroblasts were seen in one case of subacute myeloid leukaemia (16%) and in the acute phase of a case of chronic myeloid leukaemia (2.8%). In two other cases of chronic myeloid leukaemia the findings were negative. In one case of myeloid metaplasia following polycythaemia the PAS positive erythroblasts were 3.6%.

Anaemia. Five normal newborns were tested; in one case 2% of the bone marrow normoblasts were PAS positive, 0.2% were positive in another while no positive cells were found in the remaining 3 cases.

Discussion

The work of ASTALDI *et al.* describing for the first time the presence of PAS positive material in normoblasts of a large group of patients with thalassaemia (2-3) has been corroborated by similar studies carried out on smaller groups (13-14-15-16) isolated cases (17) or unspecified numbers of individuals with this disease (18, 19). ASTALDI's work also opened the way to the application of the PAS reaction to other disturbances of erythropoiesis. PAS positive erythroblasts have now been described to occur regularly in sideroblastic and sideroachrestic anaemias (20, 21-22) erythroleukaemias and Di GUOLIELMO's syndrome (14-16-17-20, 21-22-23-24) and in iron deficiency anaemia (17-21-25). In addition PAS positivity was found in erythroblasts in few or isolated cases of the following diseases: pernicious anaemia (21-22) aplastic anaemia (21) leukemias (3-17) lead poisoning (26) benzol poisoning (27) polycythaemia (21) and pyridoxine responsive anaemia (28). In all these conditions, whenever the PAS positive substance has been subjected to further investigation it proved to be glycogen (17-21-23-25-26, 33). Only FERRARA (27) observed, that the PAS positive material of erythroblasts in benzol poisoning was not digestible by saliva. However apart from the initial study of ASTALDI *et al.* (3) all subsequent reports dealing with thalassaemia have not been concerned with the elucidation of the nature of the PAS positive substance. Thus the initial interpretation, that the abnormal substance in thalassaemia is a gluco- or mucoprotein or a neutral mucopolysaccharide, has been generally accepted. It was based chiefly on the inability to obtain digestion of the PAS positive substance by saliva or diastase and also on positive protein reactions (3). SEN GUPTA *et al.* (29) suggested that the PAS positive material may be an acidic mucopolysaccharide, probably similar to the PAS positive substance observed by them in the 'foam cells of thalassaemia'.

According to observations from this laboratory the 'foam cells of the bone marrow in one case of thalassaemia major contain indeed diastase resistant PAS positive substance, diffusely distributed over the cytoplasm: the same cells however are also strongly and diffusely positive with iron stain. These two staining properties of the 'foam cell are entirely different from those of the PAS positive substances of normoblasts. After further cytochemical investigation, we concluded, that this PAS positive substance is gluco- or mucoprotein. These properties suggest that 'foam cells may contain ferritin and apoferritin, proteins which are known to have high carbohydrate content (30, 31).

The results of the present cytochemical study leave no doubt in our minds that the PAS positive material of thalassaemic normoblasts is indeed glycogen. After completion of the present study we became aware of three other reports (25-32, 33) indicating that the PAS positive material in thalassaemic erythroblasts is glycogen. These opinions have remained largely unknown*.

Before trying to interpret the phenomenon of glycogen accumulation in thalassaemia, it is useful to recapitulate the main features of the abnormality in this condition, as they arise from this and other reports.

1. PAS positivity is demonstrable mainly in polychromatophilic and to a smaller extent in very mature, pyknotic normoblasts, in agreement with the observations of ARTALDI *et al.* (3). Occurrence in red cells is rare. It follows that the percentage of PAS positive cells depends, among other factors, on the constitution of the erythroblastic population of either blood or bone marrow of given patient and at given time.

2. PAS positivity is more frequent in cells which are practically devoid of haemoglobin; it also occurs in cells carrying an haemoglobinase inclusion body. However, severe hypochromia and inclusion bodies being very frequent characteristics of thalassaemic normoblasts, more quantitative data are needed for establishing any correlation.

3. Higher degrees of PAS positivity were generally observed in severe cases of thalassaemia, while in cases of intermediate severity and in most β -thalassaemia/abnormal haemoglobin combinations, much lower degrees and even negative findings were obtained. This is in agreement with the findings of QUATTEN AND DODI (16) and of CHAMAROMA (15) who report low degrees of positivity or negative results, respectively in thalassaemia intermedia. The proportions of PAS positive cells given by ARTALDI *et al.* (3) for thalassaemia major are generally higher than ours: their material consisted only of children aged 6 months to 6 years, but no information concerning the severity of their condition is given. A notable exception to this general pattern is found in the two unusual cases of MATTEOLI AND DEL PRATO (32) who had over 30% positive cells in spite of mild condition. In the present series, occasional severe cases presented low PAS positivity in the bone marrow but no intermediate case with high positivity has been observed so far by us. As concerns thalassaemia trait, there is universal agreement that the findings are negative (3, 15, 16).

4. PAS positivity appears to be more intense in younger patients. Since survival depends on the severity of the condition and milder cases have lower degrees of PAS positivity any relationship between age and intensity of the phenomenon will have to be decided by follow-up studies. In any event, the lack of intensification of the phenomenon proves that it is not secondary to some general effect of the disease, like for instance from accumulation or intense erythropoietic stimulation. An even better proof for this is offered by the fact that PAS positivity can be demonstrated at birth, at which time none of the classical features of the condition are manifest. PAS positivity shares this characteristic of early presence with the phenomenon of haemoglobinase inclusions (34).

We have not found reference to these works in relevant textbooks, monographs or specialised papers: at the recent Symposium on Cytochemistry in Haematology the prevailing opinion that the PAS positive substance in thalassaemia normoblasts is different from the PAS positive granules in other disturbances of erythropoiesis was not disputed (26). Recently ARTALDI *et al.* have again defended their initial opinion that this substance is not glycogen (28).

5. There is no direct association of PAS positivity with the level of foetal haemoglobin, fact noted already by others (3). However PAS positive normoblasts may occur normally in low percentages in healthy newborns or young infants (17-35) and our findings corroborate this. A greater propensity for glycogen formation in the cells of infants results also from the observation of PAS positive cells in thalassemia trait at this age, while in adults with the trait the findings are negative. This tendency for glycogen formation is not necessarily linked to Hb F synthesis, but may be due to differences in the milieu or to enzymatic differences in the erythropoietic cells between early and later periods of life. Several enzymatic and metabolic differences between the red cells of cord blood and of adults have been already demonstrated (36). It should be made clear however that the presence of neither Hb F nor glycogen allows, in itself, the conclusion that the cells in thalassemia are embryonic.

Glycogen is a major component serving as an energy source in the animal kingdom. Normally erythroblasts do not contain glycogen at least not in amounts histochemically demonstrable (37) all energy being used up, or stored otherwise. Its demonstration in normoblasts under certain circumstances proves that in these cells the enzymatic pathways for glycogen synthesis are present and potentially operative (38) (fig 7). Phosphoglucomutase (PGM) and uridine diphosphoglucose-pyrophosphorylase (UDPG-P) have been identified in red cells (38). The presence of enzymes intervening in the metabolism beyond these stages, phosphorylase and UDP-glycogen-transglucosylase, is rendered necessary once glycogen formation and presumably breakdown occur in normoblasts and since glycogen accumulation has been reported in the red cells in glycogen storage disease of the phosphorylase deficient variety (37-39). PGM is responsible for the glucose 1 phosphate (G-1-P) \rightleftharpoons glucose-6-phosphate (G-6-P) reaction, the former metabolite being the necessary precursor for the synthesis of glycogen, very likely over the uridine-glucose pathway. The PGM reaction is at equilibrium at a G-6-P to G-1-P ratio of 19 to 1 (40). Thus appreciable amounts of G-1-P may be formed when increased quantities of G-6-P are fed into the system and G-1-P is removed, for instance through glycogen formation. G-6-P is also known to enhance greatly the activity of UDPG-glycogen transglucosylase (40). It is tempting to assume that increased availability of G-6-P may be a major factor in shifting the reaction toward glycogen synthesis.

Glycogen accumulation in thalassemic normoblasts, though early frequent and extensive enough as to indicate a close association to the primary disturbance of this disease, is not universally present in all cells and in all cases thus, it cannot constitute, in itself, the primary abnormality. Its presence, however suggests that

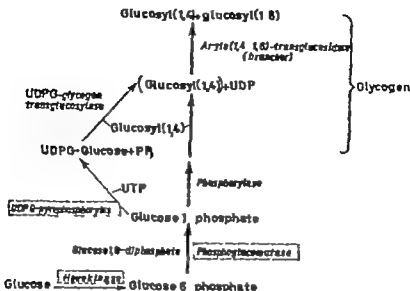


Fig 7 Pathway for glycogen synthesis. Enzymes identified in human red blood cells are placed between broken lines.

an important surplus of energy occurs in thalassaemic normoblasts. A plausible explanation for the causation of this surplus is the great reduction or complete absence of β -chain synthesis. Normally during maturation of the normoblasts, from the early polychromatophilic stage onwards, the protein concentration per unit area of cell increases rapidly to more than double of the previous values (41-42) because of intensive haemoglobin synthesis (43). Protein synthesis being an energy requiring process, any interference with globin synthesis may be responsible for the energy to be present in excess of the needs: this surplus may then be channeled into the normally latent pathway of glycogen synthesis.

The proposed hypothesis that glycogen storage in thalassaemic erythroblasts is the result of very severe impairment of haemoglobin synthesis will have to be substantiated by more detailed studies. However it is supported by the occurrence of glycogen in severe iron deficiency anaemia, in hypochromic non-sideropenic anaemia and in anaemia of lead poisoning. Recently LARIZZA mentioned the presence of PAS positive granules (glycogen?) in the cytoplasm of the 'porphyroblasts' in erythropoietic porphyria (44). Erythraemia, erythroleukaemia and several other conditions, however are not considered as presenting severe hypochromia. In

these cases the glycogen storage may be due to different causes the exact situation will be defined only by more detailed studies of the affected erythroblasts in each of these conditions, as well as of the extracellular factors which may influence glycogen deposition.

GRIGNANI *et al.* (45) have reported that the overall energy metabolism and the energy rich phosphate compounds in thalassaemic cells do not differ appreciably from normal. The results of these studies, carried out on a limited number of cases, cannot be extended to the earlier stages of the erythron. Energy production in circulating red cells is very low being restricted to the Embden-Meyerhof pathway while normoblasts contain mitochondria and the cytochrome system through which the complete citric acid cycle, the main source of ATP can operate. Furthermore, in the majority of circulating cells of thalassaemia major the reduction or cessation of β -chain synthesis has been compensated to a large extent through γ -chain synthesis (46). This compensation is expected to restrict the indirect effects of the abnormal genes, among others the surplus of energy and the need for its storage. Thus, the surplus of energy will occur only in those cells in which the entire energy producing apparatus may operate, while the use of the energy is impaired rather severely. This phenomenon of energy unbalance is expected to manifest itself only in some cells during a limited period of their life. It presupposes a certain degree of failure in the finer adjustment of energy production to the functional needs of the thalassaemic normoblast during haemoglobinization.

It is also worth noting that thalassaemic red cells have a generally higher than normal enzymatic complement (45, 47, 48, 49) including hexokinase (45). These enzymatic increases, studied so far for the majority of enzymes in only few cases, may be due in part to the younger mean age and in part to the reduction of the volume of thalassaemic erythrocytes. Information on all these aspects is certainly still fragmentary and much more extensive studies are needed. Such studies will clarify whether this pattern of increased enzymatic activity is or is not in part a further effect of deficient globin synthesis, because of which the protein synthesizing machinery – building blocks, ribosomes and energy – remains longer available for the construction of other proteins. Be this as it may the usual ways of expressing enzymatic activities may not reflect sufficiently the actual conditions prevailing in the thalassaemic

cells, whether these are smaller than normal, even in the hypophyseal stage. Thus, the measurements from the average surface of surface per cell and the thickness of cell wall, we can visualize that the concentrations of enzymes per unit of space may reach values much higher than normal. Reduction of cytoplasmic area may cause further deviations from the normal in the concentrations of the functional metabolic components of the muscular red cell. The measurements of all these changes on the regulation of metabolism and general homeostasis of the endocrine organism can be expected to be interesting.

In concerns the fine of the endocrine system, which is particularly not demonstrable in red cells, the following conditions exist. 1. Reversal of the process following reduction of energy production accompanied with treatment. 2. Enzymatic degradation, accompanied with treatment and the breaking up of the internal structure of the cells. 3. Selective premature death of some PAS positive cells in the endocrine system, in some or not very soon after onset onset and evolution. An analogous phenomenon has been proposed for the immature ovarian cells. 4. All these mechanisms may be involved, since none excludes any of the others. The combination of cases will have to be determined by further studies.

Acknowledgment: We thank Prof. S. GORDON and Dr. LAMPERT and KOPPEL for promoting the study of some of the cases. We are also indebted to Dr. GORDON and Dr. LAMPERT for some cases and to Dr. A. ROSENTHAL-ZILBER for the case of E. L. Schickelmann.

Summary

The presence of the Periodic Acid Schiff positive material in the monocytes of hemopoietic feline leukemia and related conditions has been mentioned. The existing properties and means the observation by electron indicate that this PAS positive material is protein. General, our previous and some local studies have not shown a clear cut. There is a most positive correlation between severity of the disease and degree of PAS positivity. Adult cases of feline leukemia that have PAS-negative monocytes. The findings are discussed in the light of present concepts on the pathogenesis of feline leukemia. It is suggested that accumulation of protein as means of storing the energy which may occur because of the severe reduction in hemopoietic system.

References

1. A question des substances PAS-positives dans les monocytes de la leucémie féline hémopoïétique et d'autres syndromes à cet égard. Les propriétés de structure, et surtout la dépendance par la classe de ces substances indiquant un rôle de stockage. Géographie, pathologie et les conditions, appeler celles de H. G. et T. G.

parfois dans la même cellule. Il existe une corrélation approximative entre la gravité de la maladie et l'intensité de la réaction au PAS. Ces constatations sont discutées à la lumière des conceptions actuelles sur la pathogénèse de la β -thalassémie. L'accumulation de glycogène serait un moyen d'entreposer l'énergie qui se trouverait en excédent à la suite de la forte réduction de la synthèse de l'hémoglobine.

Zusammenfassung

Die Natur des PAS-positiven Materials in Normoblasten von homozygoter β -Thalassämie und verwandten Zuständen wurde einer erneuten Prüfung unterzogen. Aus den früheren Eigenschaften und vor allem aus dem Abbau durch Diastase geht hervor daß es sich dabei um Glykogen handelt. Glykogen, Eisengranula und Einschlüsse nach Art der Heinzchen Körperchen kommen gleichzeitig in derselben Zelle vor. Es besteht eine gewisse Beziehung zwischen der Schwere der Krankheit und dem Grad der PAS-Reaktion. Erwachsene mit β -Thalassämie-Veranlagung haben PAS-negative Normoblasten. Die Befunde werden besprochen im Hinblick auf die derzeitige Auffassung von der Pathogenese der β -Thalassämie. Es wird vermutet, daß die Ansammlung von Glykogen eine Art von Energiereserve darstellt, die infolge der schweren Verminderung der Hämoglobinsynthese im Überschuß auftritt.

References

1. FERDA, L. DENDROSTIO DELL'AGUIA, M. I siderociti nel morbo di Cooley sindromi affini. *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.* 25, 1460 (1949).
2. ASTALDI, G., RONDANELLI, E. G. STROMELLI, E. Positivita della reazione di Hotchkiss su una percentuale degli eritroblasti della talassemia major (morbo di Cooley). *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.* 29, 1081 (1953).
3. ASTALDI, G.; RONDANELLI, E. G.; BERNADELLI, R. AND STROMELLI, E. An abnormal substance present in the erythroblasts of *Thalassemia major* Cytochemical investigations. *Acta haemat.* 12, 145 (1954).
4. FERAS, PR. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood* 21, 21 (1963).
5. FERAS, PR.; LOUKOPoulos, D. AND THOMELL, B. Absorption spectra of inclusion bodies in β -thalassemia. *Blood* 25, 105 (1965).
6. BAGLIONI, C. Correlations between Genetics and Chemistry of Human Hemoglobins; in *TAYLOR's Molecular Genetics*, part. I p. 405 (Academic Press, New York 1963).
7. DACEY, J. V. *The Haemolytic Anaemias*, part I, p. 33, 2nd ed. (Churchill, London 1960).
8. FERAS, PR. AND LOUKOPoulos, D. Alpha-chain of human hemoglobin Occurrence in vivo. *Science* 143, 590 (1964).
9. DANCE, N., HUXLEY, E. R. AND BEAVER, G. H. The abnormal haemoglobins in haemoglobin H-disease. *Biochem. J.* 87, 240 (1963).
10. PEARSE, A. G. E. *Histochemistry* (9a, p. 832, 9b, p. 826), 2nd ed. (Churchill, London, 1961).
11. BAREA, T. AND ANDERSON, P. *Histochemistry* p. 77 (Harper and Row New York 1963).
12. RATH, C. E. AND FISCH, C. A. Sternal marrow hemosiderin. A method for determination of available iron stores in man. *J. Lab. clin. Med.* 33, 81 (1948).
13. Haematologische Tafeln «Bando» (Bando, Basel 1952).
14. GRUBB, H. B. W. AND MITZ, J. The periodic acid-Schiff reaction as a diagnostic aid in thalassemia. *8th. ann. J. med. Sci.* 22, 7 (1957).

14. BALDOL, M., FUDENBERG, H. H., FUKUTAKE, K. AND DAMMEIER, W.: The anemia of the Di Guglielmo syndrome. *Blood* 14: 334 (1939)
15. CRAMAROSSA, L.: Sull'anomalo reperto citochimico eritroblastico nella Talassemia. *Atti delle Giornate di studio su ed problema sociale della microcitemia del morbo di Cooleys*, vol. II p. 144 (Ist. Italiano di Medicina Sociale, Roma 1961)
16. QUATTRO, N. UND DRE, E. Hämatologische, genetische und klinische Betrachtungen über einige Formen erblicher Hämoglobinopathien (300 Fälle). *Schweiz. med. Wochr.* 92: 1318 (1962)
17. QUAGLIO, F. AND HAYMON, F. G. J. Periodic acid-Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Guglielmo disease. *Brit. J. Haemat.* 6: III (1960).
18. CHATTERJEA, J. B.; CHOWDHURY A. R.; RAY N. R.; DAS GUPTA, R. C. AND RAY N. H.: Cytochemical aberration in the normoblasts of Cooley anemia. *Bull. Cal. School trop. Med.* 4: 36 (1956)
19. BEBER, M.; ALAGILLE, D. ET BAUDRON-GOMIN, J. Particularités des érythroblastes et des érythrocytes dans la maladie de Cooley Etude au microscope électronique. *Rev. Hémat.* 13: 338 (1958)
20. HAYMON, F. G. J. AND QUAGLIO, D.: Refractory sideroblastic anemia and erythraemic myelosis. Possible relationship and cytochemical observations. *Brit. J. Haemat.* 6: 381 (1960).
21. MEISLER, H. Cytochemische Beobachtungen bei Erythropathien unter besonderer Berücksichtigung von Glykogen und freien Eisen. *Schweiz. med. Wochr.* 40: 1209 (1961)
22. VERLOOF, M. C. Zur Differentialdiagnose der essentiellen sideroachretischen Anämien unter Berücksichtigung zytobiochemischer Befunde; in *Zyto- und Histochemie in der Hämatologie*. 9. Freiburger Symp. p. 553 (Springer Verlag, Berlin 1963).
23. KAWARITA, Y. AND HORIE, K. Periodic acid-Schiff reaction of erythroblasts in erythremic myelosis with special reference to the PAS positive substance. *Congr. Int. Soc. Hemat.*, Mexico, p. 230 (Grune and Stratton, New York 1962)
24. FLEISCHLACHER, H. UND KARR, P. Die praktische Bedeutung zytochemischer Untersuchungsmethoden in der Hämatologie. *Med. Welt* 35: 1785 (1963).
25. SANSONI, G., BERTOLOTTI, E. Ricerche citochimiche sugli eritroblasti di presaturazione anemici. *Atti VII Congr. Soc. Int. Emat.*, vol. II (Pensiero Scientifico, Roma 1956)
26. HECKLER, F. Polysaccharide im Blut und Knochenmarkzellen in *Zyto- und Histochemie in der Hämatologie*, 9. Freiburger Symp., p. 408 (Springer Berlin 1963).
27. FERRARA, A. Aspetti citochimici delle cellule ematiche di una eritropatia benenzolica. *Boll. Soc. Ital. Emat.* 2: 384 (1954).
28. ANTALDI, G.; STROMELLI, E. & SAULI, S. APS-positività degli eritroblasti in diverse condizioni patologiche. *Minerva Med.* 55: 1569 Suppl. 39 (1964).
29. ANTALDI, G., STROMELLI, E. AND SAULI, S. Histochemical research on erythroblasts PAS-positivity under various pathological conditions. *Proc. 9th Congr. europ. Soc. Haemat.*, Lisbon 1963 part II/1 p. 86 (S. Karger Basel 1963)
30. SEN GUPTA, P. C.; CHATTERJEA, J. B.; MUEHNERJEA, M. A. AND CHATTERJEA, A. Observations on the bone cell in thalassemia. *Blood* 16: 1039 (1960)
31. HEINKE, R. AND STRAUM, G. Zur Histochemie des Hämoidsiderins. *Virchows Arch.* 329: 373 (1953).
32. WÖRLE, F. Ferritin und Hämoidsiderin in *Zyto- und Histochemie in der Hämatologie*, p. 517 9 Freiburger Symp. (Springer Berlin 1963)
33. MATTEOLI, G. & DEL PIANO, E. Su due casi di talassemia minima monocitopenicità. *Haematologica* 46: 83 (1961)

33. STEDJANO, G. A., POLLITZER, C. Ricerche citochimiche sul polisaccaride Epidi della cellule eritriche midollari di bambini affetti da Talassemia major (morbo di Cooley) Arch. ital. Pediat. Puericuli. 16: 247 (1963)
34. FERRAS, P. R. Forms of thalassemia; in JONES Abnormal Haemoglobins in Africa, p. 71 (Blackwell, Oxford 1965)
35. EFRAFI, P.; ROZENBERG, L. AND SHAPIRA, E. The morphology of buffy coat from cord blood of normal human newborns. Blood 17: 497 (1961).
36. GROS, R. T.; SCHLORDER, E. R. AND BROWNSTEIN, S. A. Energy metabolism in the erythrocytes of premature infants compared to full term newborn infants and adults. Blood 27: 755 (1963)
37. FRANKLIN, T. A. J. The Red Cell, p. 51 (Blackwell, Oxford 1961)
38. ALTMAN, J. K. Some enzymologic aspects of the human erythrocyte. Amer. J. Med. 27: 963 (1959)
39. SCHWARTZ, J. B.; CORNBLATH, M. JR., FRIED, J. AND HOOK, E. Glycogen in erythrocytes of patients with Glycogen storage disease. Pediatrics 27: 103 (1961).
40. FIELD, R. A.; Glycogen Deposition Diseases in STAMBERG'S, WYGAMER'S AND FRIEDLICKSON'S The Metabolic Basis of Inherited Disease, p. 167 (McGraw-Hill, New York 1960)
41. GRASSO, J. A.; WOODARD, J. W. AND SWIFT, H. L. Cytochemical studies of nucleic acids and proteins in erythrocytic development. Proc. Nat. Acad. Sci. 50: 194 (1963).
42. THORELL, B. Cytochemistry of red cell maturation; in ILL. Int. Erythrocytes-Symp., Berlin 1960, p. 7 (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1960)
43. THORELL, B. Studies on the formation of cellular substances during blood cell production. Acta med. scand. 128: Suppl. 200 (1947)
44. LAKKILA, P. The problem of erythropoietic porphyria in the light of the latest advances in biochemistry and morphology. Paed. Med. 4: 315 (1957).
45. GREGGARD, F.; LORENZ, W. G.; BRUNETTE, P. ET WALLER, P. H. Le métabolisme énergétique de l'érythrocyte thalassémique. Acta haemat. 26: 293 (1962)
46. LOZANOGLOS, D. AND FERRAS, P. R. The distribution of haemoglobin types in thalassaemic erythrocytes. J. clin. Invest. 44: 231 (1963).
47. TROPEANO, L., BELFIORE, F. Alcune attività enzimatiche negli eritrociti di ammalati e portatori di Talassemia di talassemidrepanocitosi. Haemat. lat. 5: 285 (1962).
48. BELFIORE, F. L'attività latticodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassemidrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 38: 514 (1962).
49. BELFIORE, F., CALGARA, G. Attività maliccodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassemidrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 40: 493 (1963).
50. ATTALDI, G.; TOLENTINO, P., SACCHETTI, G. La Talassemia, p. 69-73 (Tipografia del Libro, Pavia 1951).

Authors' address: Drs. Ph. Yarns and Th. Papayannopoulos, Hematology Section and Laboratory Dept. of Clinical Therapeutics, Alexandra Hospital, Athens 611 (Greece).

Department of Pediatrics, Central Emek Hospital, Afula; Section of Cell Biology The Weizmann Institute of Science, Rehovoth. Laboratory of Hematology Mer Hospital, Kfar Sava. Laboratory for Blood Morphology and Cytology Kaplan Hospital, Rehovoth

Cytochemical and Genetic Studies in Four Cases of Chediak Higashi Steinbrinck Syndrome

By N. SADAN, D. YAFFE, L. ROZENKLAJN, H. ADAR, B. SOROKER AND P. EFRATI

Although the rare CHEDIAK HIGASHI-STEINBRINCK (C.H.S) Syndrome has been repeatedly described in recent years, few reports of cytochemical observations have been published, nor has the hereditary factor in this syndrome been fully determined. The present paper describes four cases of this disease which occurred in two inter related families, with emphasis on the cytochemical and genetic aspects. Clinical examinations of three of the cases are reviewed briefly; a more detailed clinical report will be published elsewhere.

Methods

Bone marrow and peripheral blood smears were examined as follows: May-Grünwald-Giemsa staining; peroxidase reaction (1); peroxidase reaction for eosinophils (2); peroxidase reaction of Levene for haemoglobin (3); alkaline phosphatase activity (3); acid phosphatase activity (4); staining by PAS method of Horrocks (5); Sudan black B staining (6); FETTER nuclear reaction (5); methyl-green pyronin staining, adaptation of KLUCK's method (7); toluidine blue staining (2); Papanicolaou blue reaction (8).

Case Histories

Case 1 M. N., 22 months old female, was admitted to hospital suffering from enlarged spleen and liver, raised temperature and extreme pallor.

The parents, Iraqi Jews, were first cousins. Of 5 siblings who died abroad in childhood, two were described as albinoids. The parents and remaining 4 siblings were in good health. The patient had a history of repeated intestinal and respiratory infections. A hepatitis of 2 weeks duration which took place 1 month prior to admission was reported.

On admission, the spleen was palpable 4 cm below the costal arch and the liver was enlarged, although only slightly. Temperature was 37° C. X-ray of the chest re-

Table I
Clinical data.

	Case 1 ♀	Case 3 ♂	Case 4 ♂
♂ Albinism		+	+
Fair hair	+	+	+
Spontaneous myasthenia	?	?	+
Lymphadenopathy	+	+	
Hepatomegaly	+	+	
Splenomegaly	++	+	+
Infiltration of lung	+	+	
Pleural effusion		+	
Purulent secretion from ear		+	
Fever	+	+	

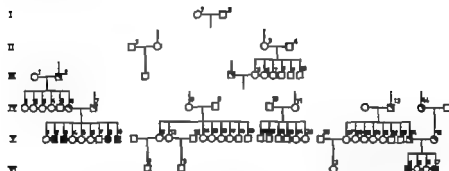


Fig. 1 Pedigree of two inter-related families with COHEN-RABINOWITZ-STERNBERG syndrome. ● ■ = Involved subjects (homozygotes); ○ □ = Presumptive heterozygotes V8, V9, VI4, VI7 = cases 1, 2, 3, 4, respectively; V2, V3 = cases reported by the parents, of children who had died abroad with typical symptoms of the syndrome.

vealed circumscribed density in the right lung. Typical signs of C.H.S. syndrome were found in haematological tests (table II).

A biopsy of the cervical lymph node (performed by Dr. E. Larv) showed that the normal follicles were replaced by diffuse increase of medullary tissue. Prominent sinuses with proliferation of lining cells were present. The medullary tissue consisted of lymphoid and reticulum cells, histiocytes and endothelial cells. Special staining revealed increased reticulum formation.

During the course of the disease, the cervical and axillary lymph nodes became enlarged. After temporary abatement of symptoms, the child left the hospital, but was readmitted with high temperature. The patient died at the age of 26 months.

Case 2; B. N. the sibling of M. N. 3 months old male, was hospitalized for investigation. The clinical examination showed albinoid appearance. Spleen and liver were normal (examined by Dr. A. Avnon). Haematological investigation revealed typical findings of C.H.S. syndrome. No additional data on the case are available.

Case 3; I. N. 25 days old male was admitted to hospital because of cough and breathing disturbance occurring on the day prior to admission. The patient was the first son of Iraqi Jews inter-related to the parents of cases 1 and 2 (fig. 1). The parents were also first cousins and in good health.

Table II
Routine blood examination.

	Case 1 ♀		Case 3 ♂		Case 4 ♂
Date	4/53	7/53	2/60	3/60	2/64
Hb, g%	10.9	3.9	8.5	2.5	9.0
Erythrocytes per cu. mm. $\times 10^9$		2.5	2.17	1.3	
Reticulocytes, %	14		1		
Leucocytes per cu. mm. $\times 10^9$	11.5	3.2	6.6		6.0-9.0
Neutrophils, %	10	6	29		4
Lymphocytes, %	76	90	70		■
Monocytes, %	14	4	1		4
Thrombocytes per cu. mm. $\times 10^9$	380		67		

The child was albino in appearance. Physical and X-ray examinations of the chest indicated the possibility of an effusion in the right pleural cavity. The liver was palpable 4 cm below the right costal arch and the spleen 2 cm below the left one. The lymph nodes were not enlarged. Haematological and bone marrow examinations showed typical findings of C. H. S. syndrome (table II).

In the course of the disease, several aspirations were performed which yielded purulent fluid. *Staphylococcus aureus* was cultured from the effusion. Later the cervical, axillary and inguinal lymph nodes became enlarged, as well as the spleen and liver. Anaemia developed and the general condition of the child deteriorated. Death occurred at the age of 48 days.

Of two female children born later to the same family one showed retardation in psychomotoric development and died at 6 months, without clinical or haematological evidence of C. H. S. syndrome. The other is at present 2 years old, and in good health.

Case 4 N A., male sibling of I. N. (case 3) 4th child in the family was born albino. Physical examination revealed no pathological findings. However typical features of C. H. S. syndrome were found in peripheral blood and bone marrow smears.

At the age of 5 months the patient was hospitalized because of obstinate anorexia. Physical examination revealed enlarged spleen, palpable 3 cm below the costal arch. The edge of the liver was also palpable. Lymph nodes were not enlarged. The child exhibited photophobia, nyctagmus and albino changes in the fundi. The haematological findings are summarized in table II. The patient died suddenly on the 18th day of hospitalization without any apparent cause being revealed by autopsy.

Results and Discussion

Morphological observations The morphology of cells in CHEDIAK HIGASHI-STEINBRINCK syndrome has already been described in early publications. Recently a detailed description was given by UNDRITZ et al. (9) and BESSIS et al. (10-11) made some interesting observations by phase contrast microscopy and also reported the first results of studies in the electron microscope. Characteristic findings in the blood are as follows: azurophil inclusion bodies (revealed by May-Grünwald-Giemsa staining) in lymphocytes, giant granules in granulocytes and irregular inclusions in monocytes (fig. 2).

In the bone marrow large cytoplasmic vacuoles were found in addition, in young granulocytes. These vacuoles were usually unstained but sometimes contained homogeneous yellow red inclusions. In others, irregular azurophil inclusions were seen, surrounded by a clear halo (figs. 3 and 4)

Earlier observations (12) have confirmed the presence of grey cytoplasmic inclusions of irregular or angular shape, observed by other authors, in granulocytes. These were previously confused with Doehle bodies, while some authors considered them to be a conglomerate of the specific granules (9). In our opinion these cytoplasmic inclusions differ from the specific granules of eosinophil and neutrophil granulocytes in May-Grünwald-Giemsa and other cytochemical stainings.

The presence of atypical mononuclear cells in the blood previously demonstrated (12) recurred in the present cases, leading to the belief that these cells are a manifestation of the disease, in the lymphatic system.

Opinion differs as to the nature of the immature vacuolated cells in the bone marrow. UNDRITZ (9) believes them to be young phagocytes belonging to the monocytic series, whereas most other authors consider them to be immature granulocytes (promyelocytes). We found in cells of this type abundant azurophil granulation in the cytoplasm, which might develop later into specific granules of mature cells. The inclusions in the large vacuoles may be precursors of the irregular cytoplasmic inclusions found in mature granulocytes (figs. 2 and 3). These, precursors sometimes resembled erythrocytes, but staining by LEFKOWITZ's method (2) failed to confirm the presence of haemoglobin.

In general, no involvement of the erythroid cells was found in this syndrome. However we encountered a binucleated cell, having basophil cytoplasm and nuclear structure similar to that of normoblasts, containing a typical inclusion body in the cytoplasm (fig. 5) (see also HIGASHI, cited by UNDRITZ, 9).

Some authors have investigated the phagocytic function of white blood cells in this syndrome (13-14). It appears to be normal, so that the presence of anomalies in the cells apparently does not interfere with the phagocytic function. We have observed in the bone marrow a significant number of cells in mitosis, containing inclusions or even large granules. The anomalies in the cells seem also not to interfere with the mitotic process (figs. 3 and 4).

Table III
Cytochemical findings.

Method	Lymphocyte		Neutrophils		
	Cytoplasm	Inclusion	Cytoplasm	Specific granules	Inclusion
M.G. Giemsa	Blue	Red-orange	Blue	Violet-plate	Orange
Peroxidase reaction	—	—	++	++	++
Peroxidase reaction for eosinophils	—	—	±	±	+
Acid phosphatase	++	—	++	++	—
Alkaline phosphatase	—	—	++	++	—
Sudan Black B	—	—	++	++	++
P. S. A.	+	+	+	+	+
Pyralin + P. A. S.	—	+	—	—	+
Feulgen	—	—	—	—	—
M. G. Pyronin	+	—	±	—	—
Toluidine blue	—	—	—	—	—
Prussian blue reaction	—	—	—	—	—
Fluorescein	—	—	—	—	—

Cytochemical observations. Staining for acid phosphatase revealed strong activity in monocytes and granulocytes. In the lymphocytes, enzyme activity was stronger than usual and was manifested often by the presence of brown granules located around the inclusion bodies, sometimes in annular form (fig 6). Strong alkaline phosphatase activity was also detected in the neutrophil granulocytes with a score of 238 (normal score 50 to 80). In some cells, unstained regions were noticed which did not reveal enzyme activity probably corresponding to the grey cytoplasmic inclusions (fig 7).

Staining for peroxidase revealed, in agreement with what has been found (9) strong activity in specific granules as well as in cytoplasmic inclusions in the granulocytes. Strong activity was also found in the cytoplasmic inclusions in monocytes. No activity whatsoever was found in the lymphocytes.

However peroxidase staining for eosinophils, as described by Urvitz (2) exhibited positive staining of the specific eosinophil granules as well as of the round cytoplasmic inclusions. In neutrophil granulocytes only the cytoplasmic inclusions were stained, and not the specific granules. Dark stained inclusions were found also in the cytoplasm of monocytes.

The PAS stain of Hotchkiss colored the cytoplasm of neutrophil granulocytes in the peripheral blood a deep diffuse red, the

Table III (continued)

Cyto- plasm	Eosinophils		Monocytes		Basophils	
	Specific granules	Inclu- sions	Cyto- plasm	Inclu- sions	Cyto- plasm	Specific granules
Blue	Yellowish-red	Gray	Gray-blue	Gray	Pink	Blue-black
	+	+	+	++		
++	++	++	—	++		+
++	—	—	++	—		
—	—	—	—	—		
+	+	+	+	++		
+	+	+	±	+		
—	—	+	—	+		+
—	—	—	—	—		
—	—		+	—		
—	—		—	—		+
—	—		—	—		
	—	—		—		

cytoplasmic inclusions appearing pale rose in color. In eosinophils, the inter-granular substance stained red, while the cytoplasmic inclusions were pale rose. The substance stained pale rose is obviously common to both types of cells. The inclusion bodies of the lymphocytes were also stained rose. The glycogen granules were stained deep red in about 3 / of the cells. In the monocytes, weakly stained cytoplasmic inclusions were seen. Pre treatment of the smears by ptyalin prevented the staining of glycogen inclusion bodies in the lymphocytes and cytoplasmic inclusions in the granulocytes resisted the effect of ptyalin. In bone marrow no staining was apparent in the erythroid cells and in the few plasma cells encountered. Weak positive staining was found in the vacuoles of some of the promyelocytes. The granulocytes were stained as in the peripheral blood. The results of Sudan black B staining for fats were identical with those reported by others: a strongly positive reaction in granulocytes and in monocytes. The inclusion bodies of lymphocytes did not stain.

According to ASTALDI et al. (15) the PAS positive inclusions of cells consist of a lipoprotein. Disturbances in fat metabolism have also been reported, and glycolipid inclusions were found in histiocytes and in renal tubular cells in C.H.S. syndrome (16). Never

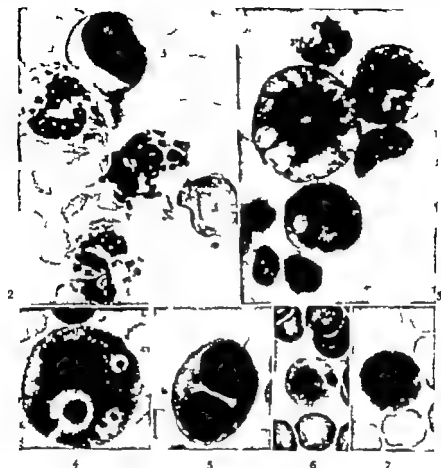


Fig 1 Neutrophil and basophil granulocytes. Lymphocyte with and without inclusion body (peripheral blood)

Fig 3 Immature granulocyte in mitosis, with acules in cytoplasm. Mature eosinophil granulocyte with giant granules (bone marrow)

Fig 4 Dividing immature granulocyte with inclusions in cytoplasm (bone marrow)

Fig 5 Binucleated normoblast with inclusion body (bone marrow)

Fig 6 Lymphocyte with positive acid phosphatase staining (peripheral blood)

Fig 7 Mature granulocyte, alkaline phosphatase positive with unstained regions in cytoplasm (peripheral blood)

theless, the basic derangement of metabolic functions of cells which cause the present syndrome remains for the time being obscure.

Genetic observations The C. H. S. syndrome has been known to have the following features of a recessive hereditary trait 1) A great proportion of the cases are descendents of consanguinous marriages

2) If there is plurality of children in the families involved, more than one child is usually affected

SANTOS SOBRINO AND MOURAO (17) mentioned the existence of a familial relationship between the two cases they present however no further details given. In the present study it was possible to trace the pedigree of the two families concerned. The pattern of occurrence of the disease is typical of a hereditary trait, which is lethal in the homozygous condition, determined by ~~an~~ recessive gene.

In fig 1 the assumed transmission pattern throughout the successive generations in the families considered here is outlined. Due to the high frequency of consanguinity two pairs in which both parents were heterozygous and a typical Mendelian segregation occurred, are found. The expected ratio of involved homozygous children to total number of children for a trait determined by one recessive gene is 1/4 the observed ratio in these two families is 5/18. The assumption that the C.H.S. syndrome is determined by only one recessive gene is further supported by a consideration of the frequency of the disease in other cases reported in which there were more than two children in the family. The number of affected children in these families was 25 out of a total of 69 (16) which is even higher than the expected number for a trait determined by one recessive gene. Thus it is very unlikely that more than one major gene is required for the expression of the disease.

Certain authors (12, 18, 19, 16) have reported that the leucocytes of some parents or siblings of affected children displayed a typical granulation. Typical inclusion bodies were also found in a small proportion of the lymphocytes in blood taken from the mother of cases 3 and 4 (fig 1 \ 35). The possibility of identifying the heterozygotes should be further investigated. The development of a reliable method for their identification might be of great value in advising members of stricken families concerning the probability of occurrence of this disease in future offspring.

Summary

Genetic, morphological and cytochemical observations in four cases of CHEDIK-HIGASHI-STEINBRINK syndrome are presented. The pattern of the syndrome in the pedigree of the families showed Mendelian segregation typical of hereditary trait determined by one recessive gene. Morphological and cytochemical studies showed that the cytoplasmic inclusions in granulocytes differed from the specific granules. Strong alkaline

phosphatase activity was demonstrated in mature neutrophil granulocytes of peripheral blood. Acid phosphatase activity was found in lymphocytes, located mainly around the inclusion bodies. Mitotic cells were found in the bone marrow containing inclusions and/or large vacuoles in the cytoplasm.

Résumé

Des observations génétiques, morphologiques et cytochimiques, faites dans 4 cas de syndrome de Chediak-Higashi-Strebnerick sont décrites. Le mode d'hérédité du syndrome correspond à celui d'un gène récessif unique. Des études morphologiques et cytochimiques ont démontré que les inclusions cytoplasmiques des granulocytes diffèrent des granulations spécifiques. Une forte activité de la phosphatase alcaline a été démontrée dans les granulocytes neutrophiles matures du sang périphérique. Une activité de phosphatase acide a été trouvée dans les lymphocytes, surtout au alentours des inclusions. Dans la moelle osseuse, des cellules mitotiques contenant des inclusions et/ou de grandes vacuoles dans leur cytoplasme ont été trouvées.

Zusammenfassung

Es wird über genetische, morphologische und cytochemische Beobachtungen bei 4 Fällen von Chediak-Higashi-Strebnerick-Syndrom berichtet. Der Erbgang zeigte das typische Verhalten eines hereditären, durch ein rezessives Gen determinierten Merkmal. Morphologisch und cytochemisch ließen sich die Zytoplasmainschlüsse der Granulozyten von den spezifischen Granula unterscheiden. Die reifen neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes zeigten eine deutliche Aktivität der alkalischen Phosphatase. Saure Phosphatase fand sich in Lymphozyten, vor allem in der Umgebung der Einschlusskörperchen. Im Knochenmark wurden mitotische Zellen nachgewiesen, deren Zytoplasma Einschlüsse und/oder große Vakuolen enthielt.

References

1. CARTWRIGHT G. E. Diagnostic Laboratory Hematology pp. 91 (Grune and Stratton, New York 1958)
2. Sander Atlas of Haematology p. 28 (Sander, Basle 1952)
3. HAPLOW L. S. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* 10: 1023 (1955)
4. ROZKVEZAJ L., MARINKA, G. AND EFRATI, P. Acid phosphatase activity in normal human blood and bone marrow cells as demonstrated by the Azo Dye method. *Acta haemat.* 30: 310 (1963).
5. CORNOLI, C., PARIANTE, F., SCIRETINI, F. Aspetti citochimici della cellula nel liquor in condizioni normali e patologiche. *Acta neurol., Napoli* 5: 776 (1955)
6. SMITH, H. L. AND STORIE, G. W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black. *J. Path. Bact.* 59: 336 (1947)
7. KURATZ, N. B. Histological staining with Methyl-Green-Pyronin. *Stain Technol.* 27: 233 (1952)
8. DACEY J. V. Practical Haematology, 2nd ed., p. 75 (Churchill, London 1956)
9. HANSEN, H., LIND, F., NILSEN, L. R., SOERHJELM, L. AND UDEWITZ, E. Die Chediak-Strebnerick Anomalie resp. erblich-konstitutionelle Riesengranulation (Granulagigantien) der Leukocyten in Nordeuropa. *Folia haemat.* 3: 152 (1959)
10. BERNI, M., BERNARD, J. ET SELIGMAN, M. Etude cytologique d'un cas de maladie de Chediak. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* 1: 422 (1961)
11. BERNARD, J., BERNI, M., SELIGMAN, M., CHAMONTEAU, J. ET GAZOT, J. Un cas de maladie de Chediak-Strebnerick Higashi. *Presse méd.* 68: 563 (1960).

12. EFRAI, P AND JONAS, W Chediak anomaly of leucocytes in malignant lymphoma associated with leukemic manifestations: Case report with necropsy *Blood* 13. 1063 (1958)
13. BARAJA, L. G. AZEVEDO, M. CORREA, J. CAR ALMO, G. AND PROSPERO, J. D.: Anomalous perleukocytic granulation. *Blood* 14. 1112 (1959)
14. PAGE, A. R. BRENNER, H. WARNER, J. AND GOOD, R. A. The Chediak Higashi syndrome *Blood* 20. 330 (1962)
15. ANTALDE, G. ET STROMELLI, E. Histochnie des granulations géantes des polynucleaires dans l'anomalie de Chediak. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* 1. 626 (1961)
16. KRITZLER, R. A.; TRENER, J. Y.; LINDERBAUM, J. MAGIDSON, J.; WILLIAMS, R. FREEMAN, R. AND PHILLIPS, G. B. Chediak Higashi syndrome. *Amer. J. Med.* 36. 583 (1964)
17. SANTOS SOBRINHO, B. MOURAO, G. Síndrome de Chediak-Higashi Apresentação de dois casos. *J. Pediat., Rio de Janeiro* 24. 341 (1959)
18. DE BASTOS, O. RIBEIRO BARROS, O. Síndrome de Bequaer-Osler-Steinbrink Chediak-Higashi. *Sangre* 5. 367 (1960)
19. BECKERE OZAR, A. Neutropenia cronica familiar con granulaciones atípicas de los leucocitos. *Bol. Soc. cub. Ped.* 15. 900 (1943)

Authors' addresses: Dr. N. Seidman, Dr. H. Adler and Dr. B. Seneviratna: Kaplan Hospital, Ashdod; Dr. D. Yaffe, the Weizmann Institute of Science, Rehovot; Dr. L. Kormanovska, Meir Hospital, Kfar Sava and Dr. P. Elrich, Kaplan Hospital, Rehovot (Israel).

Institute of Human Genetics (Head: Prof. W. LEHMANN) and the Institute of Hygiene
(Head: Prof. H. GÄRTNER) Dept. of Blood Transfusion (Chief: Dr. V. SACHS)
University of Kiel

Familial Chronic Thrombocytopenia with Platelet Autoantibodies*

By D. HARMS AND V. SACHS

In 1951 EVANS et al. (8) succeeded in proving platelet autoantibodies in the serum of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) the occurrence of thrombocytopenic autoantibodies having already been supposed by EVANS AND DUANE (7) in 1949 when observing a combination of acquired haemolytic anaemia caused by autoantibodies against red blood cells with simultaneous thrombocytopenia. This observation important for the pathogenesis of ITP has repeatedly been confirmed since that time (5 16 21 13 3 18 20 4)

EVANS et al. (7) were also the first authors to report on the familial occurrence (father and daughter) of ITP with platelet agglutinins (in the serum of the father). Without going into methodical details, SCHAAR (19) found agglutinins with part of the sick as well as of those who were not sick among the members of the family examined by her she concludes, however without giving a reason, that platelet antibodies should not be considered as aetiological or pathogenetic factors of the disease. As far as we know there have not been made other statements yet about a familial ITP with platelet agglutinins, familial thrombocytopenic purpura (WERLHOF) being only very rarely observed (for bibliographic data see 15)

We now had the occasion of examining a family with ITP and simultaneously occurring platelet autoantibodies. The proposita, a 19-year-old girl, that gave rise to the examination has suffered since the twelfth year of her life from the bleeding disease. The figure shows the pedigree of the examined members of the family. The data of the clotting analysis and of the serological investigations as well as the methods employed are given in the table.

— Herrn Prof. Dr. W. Lehmann zum 60. Geburtstag in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet.

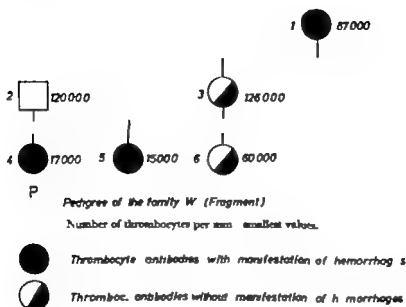


Fig 1

The tabulated data show that the *proposita*, R.W., and her two younger sisters, U.W. and G.W., have a rather marked thrombocytopenia with platelet values partially below the critical limit of 30 000/mm³. The mother of the *proposita* as well as the grandmother on the mother's side and the three sisters have platelet antibodies, which were determined by means of the antiglobulin consumption test (2, 17, 22, 23). None of the examined patients show an enlargement of the spleen or have had blood transfusions. With the sisters R.W. and U.W. an activation of the fibrinolytic system was safely excluded by means of the fibrin plate method (1). We have not stated an interaction between the antiglobulin consumption and the degree of the thrombocytopenia or the manifestations of haemorrhages.

Interesting is the statement that all the examined patients—the father excepted—have a diminution of the clotting factor IX, which goes from a small degree to a rather great one. Beyond that, G.W. has an additional diminution of the clotting factor VIII. The remarkable reduction of the clotting factor IX in familial ITP was

Table I

Name	Sex (years)	Date of Investigation	History of bleeding	Gastrointestinal Findings	Rumpel Leeds	Bleeding time (s)	Thrombocytes	
							Number of thrombocytes ($\times 10^9$)	Ag- glutination (12)
B.	♀ 74	Nov 64	occasionally small hemor- rhages of skin	0	—	4' 30"	87 000	—
P W W	♂ 47	Nov 64	0	0	—	4' 30"	120 000	—
L W	♀ 43	Oct. 64	0	0	++	4' 30"	126 000	0
L W	♀ 19	July/Aug 62	since 1957 relapsing hemorrhages of skin	sugillations	'positive	3' 20"	40 000 24 000 41 000	—
		Sept./Oct. 64	since April 64 larger hemor- rhages of skin	numerous hemorrhages of skin	++	10' 30"	19 000 17 000	0
		Dec. 64		sugillations	—	—	29 000	—
J W	♀ 16	July/Aug. 62	during infancy small hemorrhages of skin	0	0	<7"	54 000	—
		Sept./Oct. 64	since April 64 epistaxis	0	++	10	15 000	0
		Dec. 64	occasionally small hemor- rhages of skin	0	—	—	26 000	—
J W	♀ 12	Nov 64	0	0	+	6"	60 000	0
			Normal values	0	0	<7	>100 000	0

nd — not investigated, 0 negative + positive, ++ strong positive

for the first time indicated by KRICK et al (14) but we do not know for sure yet whether it has a pathogenetic significance.

The repeated occurrence of thrombocytopenia and simultaneously of platelet autoantibodies in a family cannot be caused by accidental coincidence regarding the rarity of ITP. In accordance with EVANS et al. (7) we presume that in these rare cases a familial hereditary disposition to the production of autoantibodies exists, just as there may be frequent familial cases with other diseases of an autoimmune pathogenesis. Examinations of other family members are being initiated.

Table 1 (continued)

Autoantibody consumption-test (2, 17, 22, 23)		Red cell anti- bodies	Blood group	Clotting analysis		Thrombolytic profile		
own platelets	platelets of others			Howell- time (11)	FVIII (2)	FIX (24)		k
6 steps 50%	5 steps 31%	0	A CDe/c	2' 15	119%	32%	11 45	7
0	0	0	O CDE/c	2'	111%	65%	—	—
6 steps 55%	4 steps 45%	0	A; CDe/c	1 45	70%	62%	12' 15	5
—	—	—	—	normal*	73%	50%	14 15	13
4 steps 36%	5 steps 25%	0	O CDe/C	2'	150%	62%	17 15	11
6 steps 53%	6 steps 41%	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	87%	74%	21	13
6 steps 45%	4 steps 25%	0	A; CDe/c	3'	133%	45%	21 15	12
6 steps 40%	5 steps 30%	—	—	—	—	—	—	—
8 steps 47%	6 steps 54%	0	O CDe/C	1 30*	23%	37%	13' 45	10*
0	0	0	—	<2' 15	>60%	>60%	15'	6'

Summary

Report on family with chronic idiopathic thrombocytopenia (ITP) and platelet autoantibodies (three sisters, the mother and the grandmother on the mother side) associated with diminution of the clotting factor IX. A familial hereditary disposition of autoantibodies is discussed.

Résumé

Rapport sur une famille (3 sœurs, la mère et grand-mère maternelle) souffrant d'une thrombocytopénie idiopathique chronique avec auto-anticorps anti-thrombocytes, combinée à une diminution du facteur IX de la coagulation sanguine. Une disposition familiale héréditaire à la formation d'auto-anticorps est discutée.

Zusammenfassung

Bericht über eine Familie mit chronischer idiopathischer Thrombocytopenie (ITP) und antithrombozytären Autoantikörpern (drei Schwestern, Mutter und Grossmutter mütterlicherseits) in Verbindung mit einer Verminderung des Gerinnungsfaktors IX. Eine familiäre, auf Erbfaktoren beruhende Disposition zur Autoantikörperbildung wird diskutiert.

References

1. APTUR T AND MULLERTZ, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity Arch. Biochem. 40: 346 (1952).
2. ACHÖZ, L. UND STENZKEV V. Der Anti-Human-Globulin-Konsumptionswert bei verschiedenen Krankheitsbildern. Folia haemat. (Lpz.) 80: 67 (1963)
3. AUFDERMAIER, A. UND MEYER, W. Immohämatologische Untersuchungen bei Morbus Werthof. Kasuistische Mitteilung. Helv. med. Acta 22: 446 (1955)
4. BREIDENBACH, H.; GEROLD, J. UND ZIERH, M. Nachweis und Verhalten thrombozytärer Antikörper bei Diagnostik und Therapie der chronischen idiopathischen thrombocytopenischen Purpura. Folia haemat. (Lpz.) 62: 86 (1964)
5. DAUBERT J.; DELAPONTAINE, F. ET FLEURYOT Y. Agglutination et destruction *in vitro* des plaquettes normales pour le sérum d'une malade atteinte de purpura thrombopénique aigue. Inhibition par ce sérum de la rétraction du caillot normal. Sang 23: 573 (1952)
6. DODD, W. W. The Pathogenesis of purpura haemorrhagica with especial reference to the part played by blood platelets. Arch. intern. Med. 10: 445 (1912)
7. ELLIS, R. S. AND DRAKE, R. T. Acquired hemolytic anemia. The significance of thrombocytopenia and leucopenia. Blood 4: 1196 (1949)
8. EVANS, R. S. TABAHADY, K., DRAKE, R. T., PAYNE, R. AND LIO CHU-KOYO. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia. Arch. intern. Med. 47: 48 (1951)
9. FENNEL, R., cf. JURGENS, J. UND BELLER, F. K. Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse, p. 127 (Thieme, Stuttgart 1959).
10. HARTERT H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin. Wochr 26: 577 (1948)
11. HOWELL, W. H. Prothrombin. Amer. J. Physiol. 35: 474 (1914).
12. JURGENS, J. cf. JURGENS, J. UND BELLER, F. K. Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse, pp. 139-323 (Thieme Stuttgart 1959)
13. KIMMIGES-NILSEN, F. Demonstration of thrombocytopenia and leukopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenia and leucopenia. Acta haemat. (Basel) 9: 337 (1953)
14. KUCK, W.; JURGENS, R. UND HIEFLER, E. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen beim familiären Morbus Werthof. Klin. Wochr 37: 865 (1959)
15. LUDMANN W. in BECKER Hb. d. Humangenetik, Bd. III/2 Genetik der Blutkrankheiten (Thieme Stuttgart 1965, in press).
16. MIESCHER, P., CRUCHAUD S. ET HEMMELER, G. Nouvelles acquisitions concernant la pathogénèse de la thrombocytopenie essentielle. Helv. med. Acta 19: 434 (1952)
17. MOULINIER, J. Technique de la réaction de consommation d'antiglobuline. Rev. franç. Et. clin. biol. 7: 335 (1956)
18. PFISTER, E. F. SPIELMANN, W. UND DITSCHUNEIT H. Die klinische Bedeutung des Nachweises von Antikörpern gegen Thrombozyten bei thrombopenischer Purpura. Dtsch. med. Wochr 81: 735 (1956)

19. SOMAAR, F. E. Familial idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. Pediat.* 62: 546 (1963)
20. SCHÄFER, K. H.; FISCHER, K. UND LANDRECK, G. Thrombozytär bedingte hamorrhagische Diathesen. *Dtsch. med. Wschr.* 83: 693, 756 (1958)
21. STEFANI, M.; DAMMEK, W.; CHATTERJEA, J. B.; ADILSON, E. AND MERSOCOV, I. B. Studies on platelets IX. Observations on the properties and mechanism of action of potent agglutinins detected in the serum of patient with idiopathic thrombocytopenic purpura (with note on the pathogenesis of the disease) *Blood* 2: 26 (1953)
22. STEFFEK, C. UND SCHINDLER, H. Bericht über die Verwendung des Antihämoglobulin-Ablenkungsversuches für den Nachweis eines Antileukozyten-Antikörpers bei Agranulozytosen. *Münch. med. Wschr.* 97: 469 (1955)
23. STEFFEK, C. Überblick und weitere Untersuchungen über Agranulozytosen und Leukopenien mit positivem Leukozyten-Antikörperbefund. *Wien. Z. inn. Med.* 37: 245 (1956).
24. WINTERSTEIN, A.; MARRET, R. AND STRÄUBLE, R. V. Congr. europ. Soc. Haemat., Freiburg (Springer Berlin/Göttingen/Heidelberg 1956)

Authors' address: Drs. D. Harns and V. Seckel, Inst. of Human Genetics, Institute of Hygiene, Dept. of Blood Transfusion, Univ. of Kiel, Kiel (Germany)

The Medical Clinic of the University of Milan (Director: Prof. L. Villa)

Investigations on the Chromosome Complement in Some Myeloproliferative Disorders

By G. B. PONTI, R. VALENTINI, P. M. CARRARA AND S. ERIDANI

The technical improvements introduced in the last years have greatly enhanced the investigation on the behaviour of the chromosomal pattern of human cells in several pathological conditions. In the field of myeloproliferative disorders the discovery of a typical chromosomal aberration in myelogenous leukemia, i. e. the presence of the Ph¹ chromosome, has been followed by extensive investigation with the aim to ascertain whether similar peculiarities were detectable in other disorders of the same nosographic group.

A few authors have reported changes of the chromosomal pattern in other myeloproliferative disorders which might be of theoretical value. These reports still need confirmation.

I myeloma and related disorders BOTTURA (3) reported one case of 'WALDENSTROM' disease, in which nearly all the cells of bone marrow had 47 chromosomes with well definite Extra-chromosome. Chromosomal alterations were also found by CASTOLDI (4) in one case of myeloma, but with no specific pattern. LEWIS (16) and BOTTURA (2) reported complete absence of chromosomal changes in cases of multiple myeloma. Only recently LEWIS et al. (15) found in one case of plasmacytoma 12 mitotic figures (on 50) with variable degree of aneuploidy (30, 56 chromosomes) and small percentage of polyploid cells.

I chronic lymphoid leukaemia GRANT et al. (10) reported 3 cases (in the same pedigree) in which small acrocentric chromosome, supposed to be of the 21 group, was found with nearly total absence of the short arms. This report was never confirmed in subsequent research (5, 11).

In patient with pernicious anaemia ASTALDI (1) reported numerical and morphological changes of the chromosomal pattern in bone marrow cells. On the other hand GRANTON (7) and COURT BROWN et al. (6) did not observe any significant change in the same disease.

In acute leukaemia different results have so far been reported. KATZ et al. (13) found in few cases modal number between 47 and 49, with no specific morphological alterations: the quantitative changes seemed to disappear after treatment with antimetabolites. KINLOUGH et al. (14) reported 2 cases with an extra-chromosome of the 13-15 group. A modal number of 47 was described by HUMANN et al. (12) in 3 cases; the extra chromosome belonged to the 6-12 group. A similar observation was reported in 1 case

Table I
Acute leukaemia.

Case	Examination on		Karyotype					Total examined plates	
			23	44	45	46	47		50
1	P.A. ♀	Bone marrow	1	—	—	20	—	—	21
2	G.P. ♀	Peripheral blood	—	1	1	32	—	—	34
3	R.P. ♂	Bone marrow	—	1	—	22	—	—	23
4	P.F. ♂	Bone marrow	—	—	1	27	—	4	32

Table II
Chronic myeloid leukaemia.

Case		Examination on	Karyotype					Total examined plates
			44	45	46	47	Ph	
5	G.V. ♀	Bone marrow		1	16	—	16	17
II	G.G. ♂	Bone marrow	1	—	24	—	24	25

Table III
Chronic lymphocytic leukaemia.

Case	Examination on		Karyotype			Total examined plates
			43	46	47	
7	G.B. ♂	Peripheral blood	1	28	—	29
8	P.L. ♂	Bone marrow	—	19	—	19

by WINTERBURY (19). FORD et al. found in 1 case modal number of 48, while few cells had only 47 chromosomes. In the latter ones only a small metacentric chromosome was present, while in the 48-karyotype an extra-chromosome of the 6-12 group was also present (9). PROORASO et al. (16) observed recently in 1 case modal number of 46, with absence of chromosomes of the 1-3 group and somewhat larger extra-chromosome: the finding was mainly present in the bone marrow and only in minor extent in the peripheral blood.

The present report deals with the results so far obtained in an investigation, which is still in progress at the Medical Clinic of the University of Milan. Chromosomal examination was performed usually in these studies on preparations from cultures of bone marrow and in some cases of peripheral blood.

Methods and Material

Bone marrow aspirate (1 ml) was added to Hank solutions (9 ml) and Na citrate (1 ml). Subsequently Colcemid was added (1 γ /ml) and the suspension placed at 37° for 90 minutes. The culture was then centrifuged at 1000 μ .m. for 10 minutes.

The supernatant was removed and 8 ml. of hypotonic solution (4:1 distilled water and Na citrate) were added. The mixture was then placed at 37° for 30 minutes.

The suspension was then centrifuged at 1000 μ m. for 5 minutes, the supernatant discarded and fixative added to the residual. The fixative solution was mixture of three parts of methanol to one part of acetic acid. After 30 minutes at room temperature the suspension was washed with the fixative until a clear solution was obtained. Drops of this solution were spread on previously ice-frozen slide and then evaporated on faint flame such slides may be conserved indefinitely. A short staining with diluted Giemsa solution was then performed.

For peripheral blood cell examination, a heparinized blood sample was allowed to stand at room temperature for 1 hour. Plasma was then discarded and TC 199 D&C Medium was added to the residual, to obtain a dilution of 1500-3000 cells/mm³. Plasma concentration in the final suspension should be about 30% in volume. Bacto phyto-agglutinin P D&C (0.1 cc/ml of cell suspension) and antibiotics, to prevent contamination, were also added. The culture was then placed at 37° for 72 hours, with occasional agitations.

At the end of this period the culture was centrifuged at low speed for 5 minutes and the supernatant removed. Hypotonic solution (8 ml) was added, then the suspension centrifuged and resuspended in hypotonic solution. Colcemid (1 γ /ml) was added and incubation continued at 37° for 90 minutes. The suspension was then treated as for the bone marrow preparation.

In the present investigation 16 cases of myeloproliferative disorders were studied: 4 cases of acute leukaemia, 2 cases of chronic myeloid leukaemia, 2 cases of chronic lymphocytic leukaemia, 6 cases of multiple myeloma and related disorders, 1 case of pernicious anaemia and 1 case of polycythaemia vera.

Results

The results are reported in tables I - V. The following remarks may be of some interest.

In three cases of *acute leukaemia* no chromosome abnormality was found. In case number 4 however some grossly hyperploid mitotic plates, similar to those found in multiple myeloma were observed (fig 1). It is of particular interest to note that the investigation was performed at the very beginning of the disease, when both the clinical picture and the haematological features were more consistent with a diagnosis of bone marrow hypoplasia and subsequent agranulocytosis. Diagnosis of acute leukaemia became possible only in the terminal stage of the disease when bone marrow and peripheral blood did show a stem-cell proliferation.

In the cases of *myeloid leukaemia* the presence of the Philadelphia chromosome in nearly all the plates was observed (fig 2). This morphological feature, as already reported in the literature, is represented by a partial deletion of the long arm of a chromosome in the group 21-22. The karyotype of one of these cases was studied during the period of therapeutically induced clinical and haemato-

Table II
Multiple myeloma and related disorders.

Case				Examination on	Karyotype						Total examined plates	
					45	46	47	75	90	82		129
9	Myeloma	FT ♀	Bone marrow			29	—	—	1	—	—	50
10	Myeloma	T.L. ♂	Bone marrow			38	—	1	—	—	1	40
11	Myeloma	M.R. ♂	Bone marrow			61	—	—	—	1	—	62
12	Myeloma	M.M. ♀	Bone marrow	1		28	—	—	—	2	—	51
13	Waldenström	M.N. ♂	Bone marrow	—		21	—	—	—	—	—	21
14	Reticulo- cell sarcoma	C.N. ♂	Bone marrow			28	—	—	—	1	—	29

Table I
Polycythaemia vera and pernicious anaemia.

Case				Karyotype					Total examined plates
				44	45	46	47	82	
15	Polycythaemia	C.M. ♂	Peripheral blood		—	34	—	1	35
16	Pernicious anaemia	P.M. ♀	Bone marrow	1	—	161	—	—	162



Fig. 1 Case No. 4 Acute leukaemia: two hyperploid cells.

logical remission. The persistence of the Ph¹ chromosome, at this stage of the disease, seems to stress the possible pathogenetic implication of this finding. The question of the disappearance of the chromosomal abnormality after effective treatment is still a matter of discussion, but, according to the majority of the authors, the chromosome complement remains abnormal even during remission (5-17).

No chromosome abnormality was observed in *chronic lymphocytic leukaemia*.

Myeloma and related disorders in none of the cases studied peculiar chromosomal aberrations could be observed. Some occasional aneuploidism in these cellular lines (fig 3) does not seem to be related to normal variability of modal number. Similar findings have indeed already been reported in cases of acute leukaemia and reticular sarcoma and recently also in cases of Burkitt's sarcoma (12). The anomalous chromosomal pattern which was sporadically observed in multiple myeloma does not imply the existence of abnormal cellular lines, but it seems merely an expression of occasional disturbances of cell replication, as it often happens in malignant tissues.



Fig 3. Case No. 11. Multiple myeloma: tetraploid complement.

The case of *pernicious anaemia* had just been diagnosed and was still untreated. A great amount of suitable plates could be observed: the findings of a normal chromosome complement seems therefore to exclude, at least in this case, the existence of karyological alterations.

No chromosomal abnormalities were also found in the case of *polycythemia*.

Conclusions

On the basis of the reported data the impression can be drawn that, a part from the findings of Ph¹ chromosome in chronic myeloid leukaemia, changes of the chromosomal pattern in myeloproliferative diseases are mainly aspecific, and far from constant. The findings of BOTTURA and CASTOLDI in myeloma and related disorders, of GUNZ et al. in chronic lymphocytic leukaemia and of ASTALDI et al. in pernicious anaemia were not confirmed.

A limited amount of mitotic plates with variable degree of aneuploidy and of polyploidy was however observed in some cases of myeloma and in one case of acute leukaemia. The meaning of these anomalies should not in our opinion be overemphasized as similar findings were occasionally observed in many cases of different neoplastic conditions.

A certain interest is anyway presented by the case number 4 (among acute leukaemias) in which chromosomal aberrations were detected in the initial stage of the disease, when a correct diagnosis was not yet established on the common routine examinations.

Accumulation of more data, still in progress, will allow more definite conclusions.

Acknowledgment The A.A. wish to thank Miss E. PROVERA for invaluable technical assistance.

Summary

Findings on the chromosomal pattern in some myeloproliferative disorders are reported. In plasmacytoma the results seem to exclude the presence of constant and typical changes, as reported by other authors, although occasionally abnormal mitotic plates were observed (as in other neoplastic conditions). In one case of preleukaemic stage of acute leukaemia, karyological anomalies could also be observed. The Ph¹ chromosome was observed in chronic myeloid leukaemia, also during remission.

Résumé

Nous rapportons nos observations sur les changements des chromosomes apparaissant dans certaines maladies prolifératives de la moelle osseuse. Dans le plasmocytome nos constatations semblent exclure la présence de changements constants et typiques, tels qu'ils ont été rapportés par d'autres auteurs. Occasionnellement pourtant des mitoses anormales ont été observées (comme dans d'autres maladies néoplasiques). Dans un cas d'état préleucémique d'une leucémie aigue, des anomalies de la mitose ont été observées. Un chromosome Ph¹ a été observé dans une leucémie myéloïde chronique, ainsi que durant la rémission de cette dernière.

Zusammenfassung

Es wird über das Chromosomenbild bei einigen myeloproliferativen Erkrankungen berichtet. Die Ergebnisse scheinen konstante und typische Veränderungen beim Plasmom-

system ausschließen, wie sie von anderen Autoren beschrieben worden sind. Inwieweit wurden gelegentlich abnorme Mitosen beobachtet wie bei anderen neoplastischen Krankheiten. Bei einem Fall einer präleukämischen Phase einer akuten Leukämie wurden ebenfalls karyologische Anomalien festgestellt. Bei chronischer Leukämie fand sich das Ph¹-Chromosom, und zwar auch während der Remission.

References

1. ASTALDI, G. Sul corredo cromosomico nell'anemia perniziosa. *Gazz. int. Med. Chir.* 66, 2630 (1961).
2. BOTTURA, C. AND V. EDGA, M. Chromosome abnormalities in Waldenström macroglobulinaemia. *Lancet* i, 1170, 1961.
3. BOTTURA, C. Chromosome abnormalities in multiple myeloma. *Acta haemat.* 30, 274 (1963).
4. CASTOLDI, G. L. AND RIZZI, V. Chromosomal imbalance in plasmacytoma. *Lancet* i, 829 (1963).
5. COCKY BLOWE, W. M. Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* i, 986 (1964).
6. COCKY BLOWE, W. M., JACOB, F. A. AND DOLL, R. Interpretation of chromosome counts made on bone marrow cells. *Lancet* 160 (1960).
7. DE LA CHAPELLE, A. AND GRÄNICK, R. Normal mitotic activity and karyotype of leucocytes from pernicious anaemia patients cultured in vitamin B₁₂ deficient medium. *Nature* 197, 607 (1963).
8. FITZGERALD, P. M. AND GUNZ, F. Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* ii, 130 (1964).
9. FORD, C. E. AND CLARKE, C. M. Cytogenetic evidence of clonal proliferation in primary reticular neoplasms. *Proc. 3th Cancer Conf.*, p. 129 (Academic Press, London 1963).
10. GUNZ, F., FITZGERALD, P. H. AND ADAMS, A. An abnormal chromosome in the lymph. leukaemia. *Brit. med. J.* 1097 (1962).
11. HAY, F. AND SCOFIELD, H. Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* i, 1109 (1964).
12. HUNTERFORD, D. A. AND NOWELL, P. C. Chromosome studies in human leukaemia. *J. nat. Cancer Inst.* 29, 545 (1962).
13. KEMP, N. H., S. AFFORD, J. L. AND TAYLER, L. Chromosome studies during development of human leukaemia. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Lisbon 1963 (Karger Basel/New York 1964).
14. KINLOUGH, M. A. AND RIMMON, H. Study of chromosomes in human leukaemia by direct method. *Brit. med. J.* ii, 1052 (1961).
15. LEWIS, F. J. AND FRANKS, L. An abnormal chromosomal pattern in myelomatosis. *Lancet* ii, 1014 (1963).
16. LEWIS, F. J. AND MAC-TAGHART, M. Chromosomal abnormalities in multiple myeloma. *Lancet* ii, 1183 (1963).
17. NOWELL, P. C. AND HENDERFORD, D. A. Chromosomal studies on normal and leukaemic human leucocytes. *J. nat. Cancer Inst.* 21, 35 (1960).
18. PEDORARO, L. AND PILERI, A. Anomali cromosomiche in un caso di leucemia acuta con aplasia midollare. *Haematologica* 48, 712 (1964).
19. WEIDERTZ, A. W. AND WEIDERTZ, E. D. A chromosomal abnormalities in acute myeloblastic leukaemia. *New Engl. J. Med.* 268: 233 (1963).

From Department of Clinical Physiology Glostrup Hospital, Copenhagen

Metabolism of γ G Globulin in Chronic Leukaemia

By STIG BRYDE ANDERSEN

The concentration of serum gamma globulin is frequently low in lymphatic leukaemia and increased in myeloid leukaemia. Little is known about the physiological factors responsible for these changes in the electrophoretic pattern. Like all protein in the body gamma globulin is continuously being synthesised and broken down. The serum gamma globulin concentration therefore, is a reflection merely of this dynamic equilibrium. A change in the serum concentration may thus be due either to a change in the production or to a change of the catabolic rate. In addition a change in the plasma volume might explain a change in serum gamma globulin concentration.

The purpose of this study was to determine the metabolic factors responsible for the changes in serum gamma globulin in patients with chronic leukaemia. The metabolism of gamma globulin was determined by intravenous injection of the protein labelled with I^{125} .

In studies of plasma protein metabolism it is necessary to employ pure and undenatured proteins. The gamma fraction of serum is not a pure protein but a mixture of the the immuno-globulins γ G-globulin, γ M-globulin and γ A-globulin. Table I shows some physico-chemical characteristics of the immuno-globulins and the various synonyms used for the immuno-globulins. In the present paper the WHO-nomenclature has been employed (1). γ G-globulin was used in the study because more than 80 % of the total amount of protein in the gamma fraction is comprised of γ G-globulin. It is assumed that changes in the concentration of the total gamma fraction is due mostly to changes in the metabolism of γ G-globulin.

Table I
Physicochemical characteristics of the immunoglobulins.

Data	Globulin		
	γG	γA	γM
Sedimentation constant	7 S	7 S	7 S
Molecular weight	160,000	160,000	1,000,000
Hemose content (%)	2.6	10.7	9.8
Synonyms	7S γ -globulin 6.6S γ -globulin γ -globulin γ_M -globulin	β_{2A} -globulin β_2 -globulin γA -globulin	β_{2M} -globulin 19S-globulin γ_{12} -globulin γ -macroglobulin

Table II
Clinical data concerning 16 Patients with chronic leukaemia.

Patient no.	Diagnosis	Age in years and sex	Height cm	Weight kg	Hemoglobin g/l	Serum creatinine mg/l
1	Lymphatic Leukaemia	56, f	153	60.5	121	11
2	Lymphatic Leukaemia	66, f		48.0	78	9
3	Lymphatic Leukaemia	68, f	100	46.6	124	9
4	Lymphatic Leukaemia	72, f	165	63.7	124	11
5	Lymphatic Leukaemia	79 f	156	38.5	98	6
6	Lymphatic Leukaemia	51 m	172	63.9	90	11
7	Lymphatic Leukaemia	58, m	181	85.6	136	12
8	Lymphatic Leukaemia	70, m	165	59.2	100	9
9	Lymphatic Leukaemia	70, m	177	67.4	110	10
10	Myeloid Leukaemia	87 f		36.5	94	14
11	Myeloid Leukaemia	19 m	182	74.1	129	10
12	Myeloid Leukaemia	47 m		68.8	114	13
13	Myeloid Leukaemia	68, m	165	60.4	78	11
13A	Myeloid Leukaemia	68, m	165	64.3	93	11
14	Myeloid Leukaemia	72, m	164	55.5	83	12
15	Myeloid Leukaemia	74, m	162	63.9	89	18
16	Myeloid Leukaemia	82, m	161	63.3	112	13

Materials

The study was carried out on 9 patients with lymphatic leukaemia and 7 patients with myeloid leukaemia. Two studies were carried out on patient No. 13. Data from the patients are shown in table II. They were aged 19 to 82 years and the duration of the disease after the diagnosis had been made varied from one month to 4 years. The diagnoses were based on the clinical picture and on the findings in peripheral blood and bone marrow. In addition lymph node biopsies were taken in most patients. Slight to moderate anaemia was present. Serum creatinine was normal except in patient no. 15.

γG -globulin was isolated from normal human serum by column chromatography on diethylaminoethyl cellulose. The protein was labelled with I^{131} by the iodine monochloride method (2). Further details on the preparation of I^{131} γG -globulin has been published previously (3).

Paper electrophoresis of the serum before and after the extraction of γ -globulin before calculation of the distribution ratio determined by the method of LARRELL et al. (4).

Experiments were carried out before injection of blood samples. Total serum protein concentrations were determined by the method of LARRELL et al. (4).

Plasma volume was determined by the method of LARRELL et al. (4). Since serum concentration and on it only this method were calculated.

Plasma volume

The factor (vascular compartment)

carried out by the method of LARRELL et al. (4). Since albumin is lower than that of albumin by factor 0.39 β -globulin band was corrected by a factor 1.69 (= 1/0.39) in fractions. Total serum protein concentrations were determined by the method of LARRELL et al. (4).

Patients received potassium iodide (500 mg/day) for two days before injection of γ -globulin and subsequently throughout the period of the study. A sample was taken after 111 minutes. Subsequently blood samples were taken for a period of 10 to 26 days.

Data were calculated according to the method of LARRELL et al. (4). Metabolism was calculated according to MARRAS (5). Both methods are based on the assumption that catabolism of the protein takes place exponentially and is justified for γ -globulin (6). The following formulae were used:

$$\text{injected dose} \times 0.98$$

$$\text{plasma activity per ml after 15 min}$$

the assumption that 2% of injected dose is catabolized in 15 minutes.

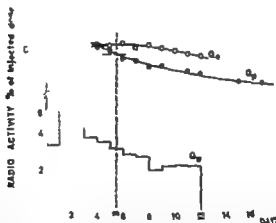


Fig. 1. Curves from turnover determination of γ -globulin in a normal subject. Q_d = plasma curve; Q_e = daily urinary excretion of radioactivity; Q_m = activity in extravascular pools; t_m = equilibrium time.

$$\frac{Q_e}{Q_{d,m}} = \frac{V}{P} = d = \text{ratio between extravascular and intravascular } \gamma\text{-globulin.}$$

Plasma pool of gamma globulin = plasma volume \times gamma globulin concentration. Fractional catabolic rate = % of plasma pool catabolized per day; Rate of synthesis = mean of gamma globulin synthesized per day. Total pool of gamma globulin = daily mean of gamma globulin (plasma pool/distribution ratio). Distribution ratio = plasma pool as a fraction of the total pool. Mean life time = average time from the production until degradation of gamma globulin molecule (= 1/fractional catabolic rate \times distribution ratio).

Table III

Data of γ G-globulin metabolism in 16 patients with Chronic Leukaemia.

Patient no.	Plasma volume l	Serum γ -globulin g/l	Plasma pool	Total pool	Fractional catabolic rate %/day	Mean life time days	Rate of synthesis g/day
1	2.71	5.5	15	26	3.1	57	0.5
2	4.20	5.9	25	50	4.0	50	1.0
3	1.98	5.7	11	24	7.4	29	0.8
4	2.81	9.7	27	57	9.1	23	2.5
5	2.46	34.4	85	184	13.4	16	11.3
II	3.52	3.5	12	21	3.6	51	0.4
7	4.15	7.8	32	53	4.7	35	1.5
8	4.00	7.4	30	63	12.8	17	3.8
9	3.70	13.4	51	115	6.3	36	1.7
10	2.25	14.4	32	65	9.6	21	3.1
11	3.74	17.8	67	113	5.4	32	3.6
I	4.02	13.9	56	95	11.0	15	6.1
II	4.88	10.2	50	94	9.8	19	4.9
13A	4.24	10.7	45	87	6.1	32	2.8
14	3.59	33.6			8.5	26	
15	2.80	12.4	35	62	16.5	11	6.1
16	3.59	35.8	128	256	10.7	18	13.7

Normal range (8)	1.9-3.7	9.6-15.3	\approx 35	42-104	4.5-9.3	21-45	1.4-4.0
Normal mean (8)	2.8	12.7	36	69	6.9	29	2.5
paraproteinaemia.							

Fig. 1 shows the curves from the determination of the metabolism of γ G-globulin in normal subject. The urinary excretion of activity was lower on the first day of the study than on the following days. This was characteristic for all the metabolic studies, indicating that the labelled γ G-globulin was not denatured. Characteristically the U/P ratio of activity after the first few days was found to be fairly constant throughout the period of investigation, indicating metabolic homogeneity of the labelled γ G-globulin.

Results

Table III gives the results from the metabolic studies on patients with chronic leukaemia. The serum gamma globulin concentration was subnormal in 7 out of 9 patients with lymphatic leukaemia. In only three of these was the plasma pool of gamma globulin below normal. In these 3 patients the rate of synthesis was below normal and in none was fractional catabolic rate increased. Neither was the mean life time of the gamma globulin molecules below normal values. In fact, the fractional catabolic rate was either normal or subnormal and the mean life time was normal or above

normal. The fractional catabolic rate was increased in two patients, but this was probably due to special circumstances which will be discussed later.

In myeloid leukaemia the serum gamma globulin concentration was normal or increased. One patient had paraproteinaemia (no. 14). It was impossible to determine the concentration of normal gamma globulin in this patient. The plasma pool of gamma globulin was normal in 3 patients and increased in the remaining 3 patients. The production of gamma globulin was increased in 4 patients.

In all patients the total body pool of gamma globulin varied almost parallel to the plasma pool, indicating that displacement of gamma globulin between intravascular and extravascular pools was not responsible for changes of the serum concentration.

Discussion

The frequency of hypogammaglobulinaemia in lymphatic leukaemia has been reported as being from 19% (9) up to 68% (10). Patients with chronic lymphatic leukaemia may be particularly susceptible to infection. Those with frequent infections can usually be distinguished by their low serum gamma globulin (11). The level of serum gamma globulin seems to be related to the duration of the disease, tending to fall with the passage of time (12). It is known that some patients with chronic lymphatic leukaemia are incapable of forming antibodies on immunization (13). These findings are in accordance with the results of the present study since the major part of serum gamma globulin consists of circulating antibodies. The low serum gamma globulin was frequently due to a low production of gamma globulin. This was found in 4 patients out of 9. On the other hand a low serum gamma globulin is not always due to a low production, but may also be due to an increased plasma volume. This seems to be the case in 3 patients in whom the plasma pool of gamma globulin was within normal limits in spite of a low serum concentration. Plasma volume is frequently increased in anaemia. Lymphatic leukaemia is often associated with anaemia, and this explains why patients with lymphatic leukaemia tend to have an increased plasma volume. In no patient was a subnormal plasma pool due to an increased fractional catabolic rate. This parameter however was increased in two patients. One (no. 8) had a normal plasma pool and a rather high production of gamma globulin. He had continuous fever, toxic polyneuritis, moderate anaemia, abdomi-

nal pains and was apparently in a hypercatabolic state. This may explain the increase in fractional catabolic rate. The other patient (no. 5) had a marked increase in serum gamma globulin. She had had bronchial asthma and chronic bronchitis for many years, probably causing the hypergammaglobulinaemia, the increased catabolic rate, and the high rate of synthesis.

GOLDEN et al. (13) studied the metabolism of I^{131} labelled gamma globulin in patients with chronic lymphatic leukaemia. The nature of the gamma globulin preparation was not specified and the metabolic homogeneity of the labelled gamma globulin cannot be judged from their data. Plasma half life averaged 13.9 days in 15 patients with lymphatic leukaemia and 6.6 days in 6 patients with breast cancer. They concluded that the synthetic as well as the catabolic rate is decreased in patients with lymphatic leukaemia. This conclusion is partly consistent with the data of the present study. However the plasma disappearance half life reported by GOLDEN et al. is much shorter than those of the present study.

In myeloid leukaemia the hypergammaglobulinaemia was due to an increase in the rate of synthesis of gamma globulin. In none of the patients was a high gamma globulin due to a low plasma volume. In two patients an increased rate of synthesis was counter balanced by an increase in fractional catabolic rate and a corresponding decrease in the mean life time of the gamma globulin molecules, so that the plasma pool of gamma globulin was normal. In no patients was a high concentration due to a decreased catabolic rate. The fractional catabolic rate was above normal in 4 patients and the mean life time of the gamma globulin molecules was shorter than normal. The increased rate of synthesis of gamma globulin is consistent with the finding that some patients with myeloid leukaemia are better antibody producers than patients with lymphatic leukaemia (13).

Summary

The metabolism of γ G-globulin was studied in 9 patients with chronic lymphatic leukaemia and in 7 with chronic myeloid leukaemia. The low serum gamma globulin in lymphatic leukaemia was due either to haemodilution on account of an increase in plasma volume or to low production of gamma globulin. In myeloid leukaemia the rise in serum concentration was due to increased production. No patient with myeloid leukaemia had decrease in the catabolic rate of gamma globulin.

Résumé

Chez 9 malades souffrant d'une leucémie lymphatique chronique et chez 7 malades souffrant d'une leucémie myéloïde chronique, le métabolisme des γ -globulines

a été étudié. Dans la leucémie lymphatique, l'hypogammaglobulinémie était causée soit par une dilution du sang à la suite d'une augmentation du volume plasmatique, soit par la diminution de la formation des γ -globulines. Dans la leucémie myéloïde, l'augmentation de la concentration plasmatique des γ -globulines était due à une production accrue. Aucun malade ayant une leucémie myéloïde n'avait de diminution de la vitesse d'atabolisme des globulines.

Zusammenfassung

Bei 9 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und bei 7 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurde der Umsatz von γ G-Globulin untersucht. Bei lymphatischer Leukämie war die Hypogammaglobulinämie entweder durch Hämverdünnung infolge Zunahme des Plasmavolumens bedingt oder durch eine verminderte Bildung von γ -Globulinen. Bei myeloischer Leukämie war die Erhöhung der Serumkonzentration auf eine gesteigerte Produktion zurückzuführen. Kein Patient mit myeloischer Leukämie wies einen verminderten Abbau von γ -Globulinen auf.

References

1. COPELAND, R. Nomenclature for human immunoglobulins. *Bull. WHO* 30: 447 (1964)
2. McFARLANE, A. S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53 (1958)
3. ANDERSEN, S. B. Metabolism of gamma₂ globulin in secondary hypogammaglobulinemia. *Amer. J. Med.* 35: 708 (1963)
4. LAURELL, C. B., LAURELL, S. AND SUNDQ, N. Buffer composition in paper electrophoresis. Considerations on its influence with special reference to the interaction between small ions and proteins. *Clin. Chem.* 2: 99 (1956)
5. LAURELL, C. B. Paper electrophoretic patterns after protein staining. *Acta. med. scand. Suppl.* 367: 9 (1961).
6. PEARSON, J. D., VEALL, N. AND VETTER, H. A practical method for plasma albumin turnover studies; in FELDINGER AND HÖFER. *Radioakt. Isotope Klin. Forsch.*, Vol. 3 Sonderband Strahlentherapie, p. 290 (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1958)
7. MATTHEWS, C. M. E. The theory of tracer experiments with 125 I-labelled plasma proteins. *Phys. Med. Biol.* 2: 36 (1957)
8. ANDERSEN, S. B. Metabolism of gamma₂ globulin (7S gamma globulin) in normal subjects and in cirrhosis of the liver. in FELDINGER AND HÖFER. *Radioakt. Isotope Klin. Forsch.*, Vol. 6 Sonderband Strahlentherapie, p. 303 (Urban & Schwarzenberg, München 1963)
9. VIDENSKJ, A. Some clinical aspects of leukaemia. *Acta haemat.* 24: 54 (1960).
10. HUDSON, R. P. AND WILSON, S. J. Hypogammaglobulinemia and chronic lymphatic leukaemia. *Cancer* 15: 200 (1960)
11. MILLER, D. G. AND KARNOWSKY, D. A. Immunologic factors and resistance to infection in chronic lymphatic leukemia. *Amer. J. Med.* 31: 748 (1961)
12. FAIRLEY, G. M. AND BODLEY SCOTT, R. Hypo- γ -globulinemia in chronic lymphatic leukemia. *Brit. Med. J.* 4: 920 (1961)
13. BARR, M. AND FAIRLEY, G. M. Circulating antibodies in reticulosis. *Lancet* i: 1305 (1961).
14. GOLDEN, R. L., MILLER, D. G. AND DIAMOND, H. D. γ -globulin metabolism in chronic lymphocytic leukemia. *J. Cancer Inst.* 29: 443 (1962).

Aus der Med. Univ. Klinik Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. HELLMEYER)
Abt. Blutspendeklinik (Leiter: Dr. M. MAYRHOFF)

Die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrozyten im niederfrequenten Bereich

VON N. KLEINE UND W. BURGASS*

In früheren Arbeiten konnte KLEINE zeigen, daß der elektrische Widerstand von Erythrozytensäulen bis zu einem Sättigungswert als Funktion der Zentrifugierzeit und der Zentrifugalbeschleunigung bei Messung mit niederfrequentem Wechselstrom zunimmt (1, 2). Hierbei verlief die zeitliche Zunahme des Widerstandes während des Zentrifugierens kinetisch wie eine Reaktion erster Ordnung, da der Differentialquotient dR/dt proportional R ist (R = Widerstand, t = Zeit).

Die Erythrozytenmembran besitzt gegenüber niederfrequentem Wechselstrom einen sehr grossen Blindwiderstand, daher kann das Zellinnere keinen Leitfähigkeitbeitrag liefern (3). Der Widerstand der gepackten Zellen kann also nur noch durch die Leitfähigkeit der Zelloberfläche und/oder der extrazellulären Kapillaren bedingt sein. Zur Abklärung dieser Frage und zum Studium weiterer Erythrozyteigenschaften wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Methodik

Als zentrifugierbare Meßzellen wurden Glasrohren von 70 mm Länge mit 1,9 bis 2,9 mm innerer Weite gewählt, in deren eines Ende eine Platinelektrode eingeschrumpft war. Die zu untersuchenden Erythrozytensuspensionen wurden durch leichte Zentrifugation angereichert und mittels Pasteur-Pipette in die Meßzellen überführt. Die abschließende Zentrifugation erfolgte bei 12000 $\times g$ in einer entsprechend abgestimmten Mikrotitrationszentrifuge (Fa. Hettig, Tuttlingen). Zur Messung des elektrischen Widerstandes wurde nach der Zentrifugation eine zweite Platinelektrode von oben her in die Meßzelle geführt, bis ein bei allen Untersuchungen einer Serie konstant gehaltener Elektrodenabstand herrschte (im allgemeinen 45 mm). Die Messungen wurden unter

* Teile dieser Arbeit wurden in der Dissertation von W. BURGASS, Freiburg i. Br. abgehandelt.

temperaturkonstanten Bedingungen (37 °C) mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät durchgeführt (Fa. wissenschaftl.-techn. Werkstätten, Weilheim/Obb., Typ LBR)

Um entscheiden zu können, ob zwischen den Elektroden einheitliche Bedingungen herrschen, wurde bei einer Meßreihe jeweils dieselbe Erythrozytensuspension für 10 min und 40 min zentrifugiert und anschließend der elektrische Widerstand als Funktion des Elektrodenabstandes gemessen.

Ergebnisse

Aus Abb. 1 geht hervor, daß bei einer optimalen Packung nach 40 min Schleuderzeit der Widerstand linear mit dem Abstand der Elektroden zunimmt, wogegen nach 10 min bei den größeren Elektrodenabständen deutlich geringere Widerstandszunahmen zu verzeichnen sind. Wertet man die Differenz beider Verläufe entsprechend aus, so ergibt sich eine lineare Zunahme der Differenz zwischen optimaler und noch nicht vollständiger Packung der Zellen.

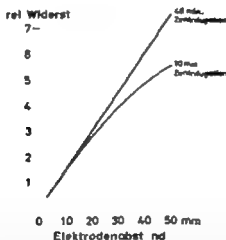


Abb. 1 Abhängigkeit des elektr. Widerstandes gepackter Erythrozyten vom Elektrodenabstand nach 10 bzw. 40 min Zentrifugation bei $12000 \times g$ und nach optimaler Packung.

Nimmt man an, daß die Leitfähigkeit von optimal gepackten Erythrozyten in der Hauptsache durch kapillare Zwischenräume bedingt ist, so müßte sich bei Änderung der Leitfähigkeit des Überstandes eine entsprechende Änderung des Widerstandes der Erythrozytensäule zeigen. Es wurde daher die Meßtemperatur und die Leitfähigkeit des Suspensionsmediums variiert, wobei bei geringeren Salzkonzentrationen die Isotonie durch Sorbit bzw. Saccharose wiederhergestellt wurde.

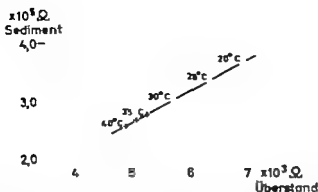


Abb. 2 Verlauf des Widerstandes gepackter Erythrocyten als Funktion des Widerstandes des Suspensionsmediums durch Veränderung der Messtemperatur

Der Hämatokrit wurde für diese Untersuchung auf etwa 40 / eingestellt und nach der Zentrifugation für 40 min bei 12000 $\times g$ zunächst der Überstand abgehoben, dann bei einem Elektrodenabstand von 20 mm der Widerstand der Erythrocytensäule gemessen und anschließend nach guter Säuberung und Trocknung der gleichen Meßzelle der Widerstand des abgehobenen Überstandes bestimmt. Auf diese Weise wurden die eventuellen Fehler durch Verschiedenheit der Meßzellen und durch Änderung des Ionengleichgewichts zwischen intra und extrazellulärer Phase während des Zentrifugierens ausgeschaltet. Wie Abb. 1 zeigt, ist die Verringerung des Elektrodenabstandes auf 20 mm nach der optimalen Packung ohne Belang, da es hier nur auf das relative Verhalten der Widerstände vom Überstand zur Erythrocytensäule ankommt.

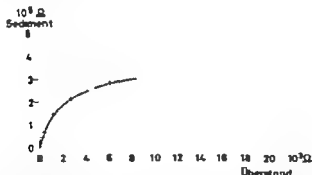


Abb. 3 Widerstand der Erythrocytensäule als Funktion des Widerstandes des Überstandes. Isoosmolestellung mit Sorbit bzw. Saccharose, Meßtemp. 37 °C.

Abb. 2 zeigt, daß eine Änderung der Meßtemperatur eine Widerstandsänderung um ca. 2 % pro °C bedingt. Es resultiert etwa der gleiche relative Verlauf wie für das Plasma oder für den entsprechenden Überstand, da sich die einzelnen Meßpunkte durch eine Gerade annähern lassen.

In Abb. 3 sind die Widerstände der Erythrozytensäule als Funktion der Widerstände des Überstandes über einen weiten Bereich wiedergegeben. Hieraus ergibt sich, daß der Verlauf einen Sättigungswert anstrebt. Bei diesem Sättigungswert weisen die gepackten Erythrozyten eine Leitfähigkeit auf, die im Mittel $(58 \pm 14) \%$ vom Meßwert bei Aufschwemmung in *not. NaCl* beträgt. Da in der Umgebung des Sättigungswertes die Widerstände des Suspensionsmediums keinen Einfluß auf die Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten ausüben, muß dieser Wert einen konstanten Widerstand darstellen, der schematisch parallel zum Widerstand liegt, welcher vom Suspensionsmedium abhängt. Werden die gemessenen Werte der Abb. 3 hinsichtlich dieses Befundes entsprechend korrigiert, so ergibt sich eine Gerade, die eine lineare Abhängigkeit der Widerstände des Erythrozytensedimentes und des Suspensionsmediums nachweist (Abb. 4). Die Leitfähigkeit der Zellsäule beträgt dann nur $(0.45 \pm 0.02) \%$ der des Suspensionsmediums.

Die Erythrozytenmembran weist im pH-Bereich von 6–8 unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Viskosität und Anionenpermeabilität auf, obwohl der isoelektrische Punkt bei etwa 1.8 liegt (4,5). Es wurde daher auch hier der Einfluß der

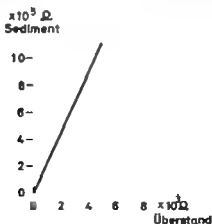


Abb. 4 Verlauf des Widerstandes der Erythrozytensäule in Abhängigkeit vom Suspensionsmedium nach Korrektur der Meßwerte mit dem Sättigungswert nach Abb. 3.

Wasserstoffionenkonzentration gemessen. Bei pH 6,7 ergab sich ein breites Maximum und bei pH 6,2 ein schmales ausgeprägtes (Abb 5) Die Untersuchung mit geringen Ionenkonzentrationen scheiterte an der ungenügenden Pufferkapazität gegenüber der der Erythrozyten, wodurch eine Änderung des konstanten Parallelwiderstandes nicht bestimmt werden konnte.

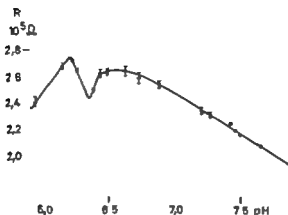


Abb 5. Abhängigkeit des Widerstandes der Erythrozytenstule vom pH Wert der Aufschwemmung Meßtemp. 37 °C.

Einige proteolytische Enzyme werden dazu benutzt, menschliche Erythrozyten zum Nachweis kompletter Antikörper vorzubereiten (6, 7) und es wurde wiederholt nachgewiesen, daß diese Enzyme eine Verminderung der Oberflächenladung des Erythrozyten beim Suspendieren in neutralem Puffer bewirken (5, 8, 9, 10). Darüber hinaus konnte über eine starke Verminderung der Potentialschwelle für die Anionenpenetration durch das Andauen der Erythrozytenoberfläche berichtet werden (1). Die Änderung des elektrischen Widerstandes der gepackten Erythrozyten nach Behandlung der Zellen mit Papain und Bromelain gegenüber den Kontrollen (Methodik nach 10) zeigt Tabelle I.

Tabelle I

Widerstandesnahme der Erythrozytenstule nach enzymatischer Behandlung der Zellen gegenüber Kontrollen.

Papain	53 ± 5%
Bromelain	65 ± 6%

Zur Beantwortung der Frage, ob sich der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand durch das Andauen mit verändert, wurden Messungen entsprechend den in Abb 2 dargestellten Ergebnissen angeschlossen, indem die Leitfähigkeit des

Tabelle II

Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes auf Grund von Behandlung der Erythrozytenoberfläche mit proteolytischen Enzymen gegenüber den Kontrollen.

Papain	$56 \pm 7\%$
Bromelin	$65 \pm 6\%$

Suspensionsmediums variiert wurde. Aus der Tabelle II geht hervor daß sowohl Papain als auch Bromelin eine signifikante Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes verursacht.

Errechnet man aus den Meßwerten den Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit, so ergibt sich, daß bei den enzymatisch behandelten Erythrozyten die Leitfähigkeit der gepackten Zellen gegenüber der des Suspensionsmediums ebenfalls geringer ist als bei den Kontrollen (Tabelle III). Aus den Werten der gemessenen Widerstände ergibt sich daß die Widerstandserhöhung der gepackten Zellsäule bei Suspension in physiol. Kochsalzlösung nach Behandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen durch die Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen als auch abhängigen Widerstandes verursacht wird. Dies bedeutet, daß die beiden Widerstandskomponenten der Erythrozytensäule nicht voneinander unabhängig durch die Enzymbehandlung verändert werden.

Es ist bekannt, daß sich einige hydrophile Kolloide leicht an die Erythrozytenmembran anlagern, wobei der Exponent der Freundlichschen Adsorptionsisothermen über 1 liegt, was für eine Mehrschichtadsorption spricht. Zur Untersuchung des Einflusses der adsorbierten Schichten auf den Widerstand der gepackten Erythrozyten wurden die Erythrozyten in einem Suspensionsmedium gewaschen, welches einmal 10 mg Kollidon (K 60 Firma BASF Ludwigshafen) pro 100 ml und zum anderen 10 g Dextran (FDR 931 Fa. Knoll, Ludwigshafen) pro 100 ml enthält. Aus Tabelle IV geht hervor daß der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand bei Kollidon um 52 / gegenüber den Kontrol

len erhöht ist, wogegen der Dextranzusatz keinen signifikanten Einfluß ausübt.

Tabelle III

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten von der Leitfähigkeit des Überstandes nach Behandlung der Membranen mit proteolytischen Enzymen.

Isot. NaCl	0,38 \pm 0,02%
Papain	0,24 \pm 0,03%
Bromelain	0,23 \pm 0,02%

Tabelle IV

Veränderung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes durch Zusatz von 10% Dextran und 10% Kollidon zum Suspensionsmedium gegenüber den Kontrollen.

Kollidon	+ 52 \pm 2%
Dextran	- 1,2 \pm 2%

Den prozentualen Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit gibt Tabelle V wieder. Hiernach ist auch nur beim Kollidon eine Änderung gegenüber den Kontrollwerten zu verzeichnen. Ebenso wie bei der Enzymbehandlung ist auch hier die Änderung des Gesamtwiderstandes der Zellsäule durch eine Erhöhung des vom Suspensionsmedium abhängigen als auch unabhängigen Widerstandes verursacht.

Tabelle V

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit des Überstandes bei Zusatz hydrophiler Kolloide.

Isot. N Cl	0,48 \pm 0,02%
Kollidon	0,37 \pm 0,05%
Dextran	0,48 \pm 0,02%

Blutgruppenspezifische Antiseren führen bei Erythrozyten mit entsprechenden Antigenen zu einer ausgeprägten Agglutination, wobei die makromolekularen Antikörper zu einem Zusammenhaften der Zellen führen. Ob hierdurch die elektrische Leitfähigkeit der Erythrozytensäule beeinflußt wird, sollten nachstehende Untersuchungen ergeben. Hierzu wurde dem Suspensionsmedium entsprechendes, gegen aqua bidest. dialysiertes Antiserum zugegeben. Die Agglutinationsstärke war im serologischen Sinne ++. Der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand war bei den

untersuchten Serumzusätzen nicht signifikant gegenüber den Kontrollen verändert (Tabelle VI). Hingegen wird durch die Antisera nur der vom Suspensionsmedium abhängige Widerstand eindeutig erniedrigt (Tabelle VII).

Tabelle VI

Vom Suspensionsmedium unabhängiger Widerstand $\times 10^8 \Omega$ (Sättigungswert) bei Zusatz von Antherum.

Anti-A	$3,75 \pm 1,2$
Anti-B	$3,7 \pm 0,1$
Kontrollen	$3,65 \pm 0,1$

Tabelle VII

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten von der Leitfähigkeit des Überstandes bei Zusatz von spezifischen Antisera.

Anti-A	$0,51 \pm 0,04\%$
Anti-B	$0,76 \pm 0,03\%$
Kontrollen	$0,38 \pm 0,02\%$

Xylit wirkt in hohen Konzentrationen hämolysefördernd, obgleich der Stoffwechsel des Erythrozyten nicht nachteilig beeinflusst wird (11). Es wurde daher vermutet, daß durch Xylit die Stabilität der Zellmembran verändert wird. Zum Studium des Einflusses von Xylit auf die Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten wurden Suspensionsmedien aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von *mot.* Xylit und *mot.* NaCl-Lösung hergestellt. Aus Abb. 6 geht hervor, daß auch bei diesem Versuchsansatz der Kurvenverlauf offenbar einem Sättigungswert zustrebt, jedoch ist sein Wert gegenüber dem in Abb. 3 um ein Vielfaches größer.

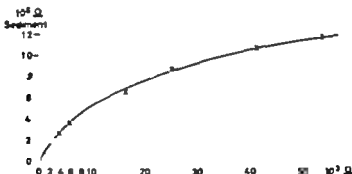


Abb. 6. Widerstand der Erythrozytensuspension als Funktion des Widerstandes des Überstandes. Isotonieeinstellung mit Xylit. Meßtemp. 37°C .

Bekanntlich erleiden die Erythrozytenmembranen während der Lagerung erhebliche Veränderungen, die sich auch auf den Widerstand der gepackten Zellen auswirken. In Abb 7 sind die Mittelwerte aus 5 Konserven dargestellt. Demnach erfolgt der steilste Abfall des Widerstandes zwischen dem 7 und 15 Tag nach der Blutentnahme, um dann zu einem weniger starken Abfall überzugehen.

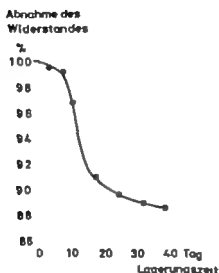


Abb 7 Änderung des Widerstandes gepackter Erythrozyten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Vollblutkonserven bei +4 °C.

Diskussion

Da der elektrische Blindwiderstand der Erythrozytenmembran für niederfrequenten Wechselstrom bedeutend größer ist, als den gemessenen Werten für die Erythrozytensäule entspricht, weisen die Befunde nach Abb. 3 und 4 darauf hin, daß sich der Gesamtwiderstand der Zellsäule aus 2 Komponenten zusammensetzt.

Der vom Suspensionsmedium abhängige Widerstand ist durch die Leitfähigkeit kapillarer Zwischenräume zwischen den einzelnen Erythrozyten zu deuten, wobei sich diese Zwischenräume nicht durch ein längeres Zentrifugieren, selbst bei relativ hohen g-Zahlen, vermindern lassen, wenn die optimale Packung der Zellen erreicht ist. Der Widerstand der Zellsäule ist dann nicht mehr zu erhöhen. Demnach reichen die bei $12000 \times g$ entstehenden Zentrifugalkräfte nicht aus, um die Erythrozytenoberflächen restlos anzu-

nähern. Es müssen daher entweder starke Kräfte existieren, die eine innige Berührung der Zelloberflächen verhindern, was jedoch durch die vorhandenen elektrischen Ladungen nicht erklärt werden kann, oder aber die Erythrozyten werden von einer Hülle umgeben, die so fest mit den Membranbausteinen verankert ist, daß sie sich nicht abschleudern läßt. Eine derartige Hülle ist z. B. durch die Hydratation der in der Membranoberfläche vorhandenen hydrophilen Kolloide gegeben.

Im isoelektrischen Punkt weisen die Kolloide bekanntlich einen minimalen Hydratationsgrad auf, was sich in manchen physikalisch-chemischen Eigenschaften äußert. So konnte z. B. Kikorez (1) schon früher zeigen, daß bei pH 6,7 die Viskosität von Erythrozyten aufschwemmungen ein Minimum durchläuft. Wird hierbei nämlich konstanter Hämatokrit vorausgesetzt, so können gewaschene Zellen mit ihrer glatten Oberfläche keine Viskositätsänderungen bei verschiedenem pH Wert hervorrufen, wenn nicht Molekülschwärme eine Vernetzung zustande bringen, die je nach Hydratationsgrad eine unterschiedliche Stärke aufweisen.

Ferner ergab sich bei früheren Untersuchungen, daß der Ladungszustand der hydrophilen Kolloide die Potentialschwelle für die Anionenpermeabilität der Erythrozyten beeinflußt, die ebenfalls bei pH 6,7 und andeutungsweise auch bei pH 6,2 einen Minimalwert besitzt (1). Bei der Messung des Widerstandes der Zellsäule in Abhängigkeit vom pH Wert ergab sich auch hier ein Maximum bei pH 6,7 und bei pH 6,2.

Ein weiterer Hinweis auf die Hydratation der Zelloberfläche ergibt sich durch die Erhöhung des Widerstandes nach Behandlung der Zellen mit proteolytischen Fermenten. Diese Enzyme verursachen neben einer integralen Ladungsverminderung der Erythrozytenoberfläche auch ein Herauslösen von N-Acetyl-neuraminsäurehaltigen Mucoiden (12) und bewirken eine starke Erniedrigung der Potentialschwelle für die Anionenpermeabilität (1). Auf Grund des Verlustes der Membran an hydrophilen Mucoiden läßt sich somit die Widerstandserhöhung durch eine Verminderung der Hydrathülle des Erythrozyten erklären.

Der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand ist durch eine konstante Eigenleitfähigkeit der Erythrozyten deutbar, da sich dieser Widerstand nicht durch die Leitfähigkeit des Suspensionsmediums beeinflussen läßt. Ferner bleibt dieser Wider-

stand unverändert, wenn auf Grund des Zusatzes von agglutinierenden Antisera die interzellulären Zwischenräume in obigem Sinne vergrößert werden.

Hingegen verringert sich die Eigenleistfähigkeit der Erythrozytenoberfläche durch die Veränderungen der Membran auf Grund enzymatischer Behandlung oder durch Adsorption von Kolloiden. Nach den Versuchsergebnissen bewirkt eine Verringerung der Eigenleistfähigkeit der Erythrozytenmembran auch eine Verminderung der interzellulären Zwischenräume, so daß offenbar ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Eigenleistfähigkeit der Membran und der Hydratation hydrophiler Kolloide zu bestehen scheint.

Diese Befunde sind für mancherlei Untersuchungen bedeutungsvoll, da durch die hier angeführten Messungen Aussagen über den Hydratationsgrad und den Mindestabstand der Erythrozytenoberflächen gemacht werden können. So ist z. B. die Möglichkeit gegeben, ohne Zusatz von Farbstoffen oder radioaktiv markierten Substanzen, die alle auf Grund gewisser Anlagerungsfähigkeiten von den Erythrozyten adsorbiert werden, die Größe der zwischen den Zellen nach der Zentrifugation eingeschlossenen Flüssigkeitsmenge («Trapped-Plasma») zu bestimmen. Nach den hier geschilderten Untersuchungen ist der nur von der Leistfähigkeit des Suspensionsmediums abhängige Widerstand streng proportional dem Kehrwert der eingeschlossenen Flüssigkeitsmenge, so daß nach optimaler Packung der Zellen nur (0.45 ± 0.02) / des Erythrozytenvolumens als «Trapped Plasma» zu berücksichtigen sind.

Ferner bedeuten die mit agglutinierenden Antisera erhaltenen Befunde, daß durch die Antikörper die Erythrozytenzwischenräume größer sind als durch die Hydrathülle bedingt. Demnach hat man bei der Agglutination keine optimale Annäherung der Erythrozytenoberflächen, was durch eine relativ starre Brückenbildung der Antikörper verursacht sein kann, da selbst die hohen Zentrifugalkräfte es nicht vermögen, das Minimum der Abstände der Zellen zu erreichen.

Es ist seit längerem bekannt, daß die Membranen während der Lagerung einen Abstrom von Lipiden erleiden. In Abb. 7 nimmt der Widerstand der gepackten Zellen mit zunehmender Lagerungszeit des Blutes ab was auf eine zunehmende Hydrierung der Membranoberflächen hinweist. Somit müssen während der Kon-

servierungszeit mehr hydrophile Gruppen der Zellen zur Wirkung kommen. Dies könnte durch den Abstrom von Substanzen verursacht sein, deren nach außen wendende Gruppen lipophil sind, jedoch mit hydrophilen Gruppen an den hydrophilen Struktur erweisen angelagert waren.

Zusammenfassung

Der elektrische Widerstand gepackter Erythrocyten wird durch 2 Komponenten verursacht. Der eine Teilwiderstand ist abhängig von der Leitfähigkeit des Suspensionsmediums und wird auf kapillare Zwischenräume zwischen den Zellen zurückgeführt, die wiederum vom Hydrationsgrad der Erythrocytenoberfläche abhängen. Die andere Komponente stellt einen konstanten Widerstand dar, der sich nur durch Behandlung oder Verödung der Membran beeinflussen läßt. Daher ist dieser Widerstand als Oberflächenwiderstand der Erythrocyten anzusehen. Es ist somit die Möglichkeit gegeben, durch Messung des Widerstandes gepackter Erythrocyten Aussagen über den möglichen Mindestzwischenraum und die Hydratation der Oberflächen zu machen.

Summary

The electric resistance of agglomerated erythrocytes is caused by 2 components. One part of the resistance depends on the conductivity of the suspension medium and is attributable to the capillary interstices which depend on the hydration degree on the surface of the erythrocytes. The other component is a constant resistance which is only influenced by changes in the membrane. Therefore this resistance can be considered as resistance of the surface of the erythrocytes. So it is possible that in measuring the resistance of agglomerated erythrocytes one can estimate the smallest interstices as well as the hydration of the surfaces.

Résumé

La résistance électrique d'érythrocytes agglomérés est causée par deux composantes. Une partie de la résistance dépend de la conductibilité du milieu de suspension et est due à des interstices capillaires qui dépendent du degré d'hydratation de la surface des érythrocytes. L'autre composante est une résistance constante qui n'est influencée que par des changements de la membrane. Cette résistance peut donc être considérée comme étant la résistance de la surface des érythrocytes. Ainsi il devient possible en mesurant la résistance d'érythrocytes agglomérés d'évaluer l'interstice le plus petit possible et l'hydratation des surfaces.

Literatur

1. KLEIN, N. Der Chromatinbau in menschliche Erythrocyten. Habilitationsschrift, Freiburg i. Br. 1963.
2. KLEIN, N. The electrical resistance of the red cell column and its relation to the trapped Plasma. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Limbon 1963 (Karger Basel/New York 1964).
3. RAJEWKY, B. UND SCHWAB, H. Die Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen. Naturwissenschaften 35, 315 (1948).

4. POWDER, E. Hemolysis and Related Phenomena (Grune und Stratton, New York 1948).
5. KUNDSCHTETSCH-BAUER, G. Erfahrungen bei der Elektrophoresis von Blutsedimenten. *Ergeb. Bluttransf.Forsch., Bibl. haemat., Basel* 12: 1 (1961).
6. MONTOM, J. A. AND POKLER, M. M. Use of trypsin in the detection of incomplete anti-Rh antibodies. *Nature, Lond.* 159: 779 (1947).
7. WIDMER, A. S. AND KATZ, L. Studies on the use of enzymetreated red cells in tests for Rh sensitization. *J. Immunol.* 65: 51 (1951).
8. POWDER, E. Effects produced by trypsin on certain properties of the human red cell. *Blood* 6: 350 (1951).
9. POWDER, E. AND POWDER, R. V. The electrophoretic velocity of human red cells, their ghosts and mechanically produced fragments and of certain lipid complexes. *J. gen. Physiol.* 43: 503 (1960).
10. SEEMAN, G. V. F. UND ULLSCHLACKE, G.: Die elektrophoretische Beweglichkeit von Erythrocyten nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen und Antiseren. *Klin. Wochr.* 40: 699 (1962).
11. KLEIN, N. UND MATTHEIS, M. Die Lagerung von *Erythra. nematocytus*. *Ungar. Haemat. Kongr. Ptes* 1963, *Haemat. hung.* 4: 145 (1964).
12. KLEIN, E. UND ULLSCHLACKE, G. Über neuraminhaltige Mucopolysaccharide aus Menschenerythrocytenstroma: ein Beitrag zur Chemie der Agglutinogene. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 375: 151 (1960).

Adress der Autoren: Dr. Dr. N. Klein und Dr. W. Seeman, Med. Univ.-Klinik, Hauptstrasse 58,
70 Freiburg i. Br. (Deutschland)

Varia

XIth Congress of the International Society of Haematology

The XIth Congress of the International Society of Haematology will be held in Sydney Australia, from August 21st to 26th, 1966.

Scientific programme The scientific sessions will be held at the University of Sydney. The morning sessions will consist of two simultaneous plenary meetings and the afternoon sessions will deal with a wide range of topics in papers, symposia and round-table discussions. The following topics have been chosen for the plenary sessions: The lymphoid cell in health and disease; nutrition and anaemia; leukaemogenesis; genetic red cell metabolism; coagulation red cell production and destruction factors in thrombosis leucocyte and platelet physiology; haemoglobin structure.

Language Papers may be given in either English or French. There will be no simultaneous translations at this Congress. This is in accordance with the decision of the meeting of Councillors in Stockholm in 1964. However it is planned to have available for members of the Congress at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to the Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Haematology, 1 York St., Sydney N.S.W. Australia.

XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion

The XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion will be held in Sydney Australia, from August 24th to 29th, 1966. The Congress will follow immediately after the XIth Congress of Haematology and Joint Plenary Sessions have been arranged for Thursday August 23th, and Friday August 26th, 1966.

Scientific programme It is planned to hold two plenary sessions each morning. The following subjects have been chosen for the plenary sessions, the first four being combined sessions with the Congress of the International Society of Haematology: Recent advances in blood genetics; white cell and platelet physiology red cell metabolism; structure of haemoglobin auto-immunity extra-corporeal circulation organ transplantation; plasma proteins. The afternoon sessions will be devoted to papers on selected subjects, e.g. new aspects of blood and serum groups fractionation of blood; plastics in blood transfusion automation in blood banks coagulation disorders immuno-haematology including haemolytic disease of the newborn; preservation of blood.

Language Papers may be given in either English or French. It is planned to have available for members of the Congress, at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to the Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion, 1 York St., Sydney N.S.W. Australia.

Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Güntherschen Porphyria congenita

VON LUDWIG HEILMEYER UND ROMAN CLOTTEN

Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Güntherschen Porphyrie liegt nach allgemeiner Meinung in einem Defekt der Isomerase (1). Dieses Ferment bewirkt die Synthese des Uroporphyrins vom Typ III aus Porphobilinogen. Wird die Isomerase etwa durch Erhitzen des Blutes auf 60 bis 65 °C geschädigt, so entsteht im Inkubationsversuch *in vitro* die Isomerenstruktur I des Uroporphyrins, welche für die Häm-synthese unbrauchbar ist. Derselbe Vorgang spielt sich im Organismus des Kranken mit Güntherscher Porphyrie ab. Das nicht verwertbare Uroporphyrin I und das daraus entstehende Coproporphyrin I werden im Harn und Stuhl ausgeschieden. Durch Einlagerung dieser Porphyrine in der Haut entsteht die Lichtsensibilisierung bei diesen Kranken. Neuerdings ist aber gezeigt worden, daß der Isomerasedefekt nicht alle Erscheinungen der Güntherschen Porphyrie zu erklären vermag (3, 6). Es zeigte sich nämlich im Syntheseversuch mit Bluthämolyzat von Kranken mit Güntherscher Porphyrie, daß das Blut dieser Kranken weit mehr Porphyrine bildet als normal. Es könnte nun sein, daß die vermehrte Anflutung von Porphyrinvorstufen zu einer relativen Insuffizienz der Isomerase führt, wodurch Porphyrine vom Isomertyp I neben III gebildet werden, welche dann das Krankheitsbild der Güntherschen Porphyrie verursachen. Um diese Dinge zu klären, haben wir mit dem Bluthämolyzat unseres Patienten Popke (2) die Uroporphyrinbildung aus Porphobilinogen *in vitro* untersucht und die Ergebnisse mit denen aus gesundem Blut verglichen, nachdem ähnliche Untersuchungen unter Zusatz von δ -Aminolavulin-säure bereits in unserer ersten Arbeit veröffentlicht worden sind (2). Die Ergebnisse sind in den Tabellen I-III und Abb. 2 niedergelegt. Bezüglich der Methodik sei auf unsere Monographie «Störungen der Häm-synthese» hingewiesen (3).

Tabelle I
Normalbluthämolyzate
Zusatz von Pbg/100 ml Ery Inkubationszeit 2 Stunden
pH 7.4 Angegebene Werte in $\mu\text{g}/100$ ml Ery Masse.

	Vorwert	Zusatz von 10 μmol Pbg (2,45 mg)	Äquival. μg Pbg.	Zusatz von 100 μmol Pbg. (24,5 mg)	Äquival. μg Pbg.
δ -ALA	38	43	—	40	—
Pbg	26	277	277	5150	5150
Uro	2	386	412	4160	4425
Copro	3,7	980	1343	7095	9715
Proto	38	99	159	264	425
Äquival. Pbg nach Abzug des Vorwertes			2193		19633
Gesamtsyntheseleistung Äquival. μg Pbg			1916		14483
Verlust an Pbg			14,8%		19,8%

Tabelle II
Bluthämolyzate (Günthersche Porphyrie)
Zusatz von Pbg/100 ml Ery Inkubationszeit 2 Stunden
pH 7.4. Angegebene Werte in $\mu\text{g}/100$ ml Ery Masse

	Vorwert	10 μmol Pbg. (2,45 mg) nach Abzug Leervwert	Pbg. Äquival.	100 μmol Pbg. (24,5 mg) nach Abzug Leervwert	Pbg. Äquival.
δ -ALA	52	36	—	36	—
Pbg	234	274	274	2048	2048
Uro	709	1472	1566	19000	20268
Copro	529	342	469	817	1121
Proto	210	76	123	239	365
Pbg-Äquival. nach Abzug Leervwert			2432		23802
Gesamtsyntheseleistung Äquival. μg Pbg			2156		21754
Verlust an Pbg			18 μg = 0,75		698 μg = 2,85

Wie die Betrachtung der Tabellen I und II zeigt, ist die Leistung der Porphyrinsynthese im Bluthämolyzate der Güntherschen Porphyrie bedeutend höher als im normalen Bluthämolyzate. Besonders bei einer Vorlage von 100 μMol Porphobilinogen tritt der Unterschied deutlich hervor. Das zugesetzte Porphobilinogen ist nach 2 Std. im Porphyrie-Blut fast völlig umgesetzt, während bei normalem Blut in derselben Zeit noch über $\frac{1}{3}$ der zugesetzten Menge unverbraucht vorhanden ist. Dieser Befund einer höheren Syntheseleistung des Porphyrieblutes stimmt völlig mit unseren

Tabelle III

	Anteil Isomere I		Anteil Isomere III	
	Verlage von 10 μ Mol	100 μ Mol	Verlage von 10 μ Mol	100 μ Mol
Gesundes Blut	Spuren	0,9%	100%	99 1%
Blut Popko	88%	79%	12%	21%

fr6heren Befunden nach Zusatz von δ -ALA 6berein (2). Dasselbe fanden auch WATSON und Mitarb. (6). Die Fermentaktivit6ten sind im Blut des Patienten Popko gesteigert, sowohl was die Delta ALA Dehydratase (7) wie auch die Porphobilinogen Deaminase betrifft.

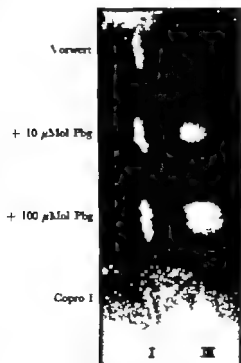
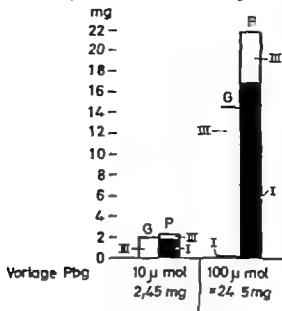


Abb. 1

Bestimmt man in dem gebildeten Coproporphyrin die Anteile der Isomeren I und III, so ergibt sich, wie Tabelle III zeigt, eindeutig das Versagen des Ferments Isomerase bei dem verschiedenen Substratangebot (10 μ Mol und 100 μ Mol Pbg). Bei h6herem Angebot wird – wie bei jeder Fermentreaktion – eine h6here Umsatzlei-



G = Versuch mit gesundem Blut, P = Versuch mit dem Patientenblut, I = Copro I
III = Copro III

Abb

stung erzielt. Während bei 10 µMol nur 12 / des normalen Isomerentyps III gebildet werden, werden bei 100 µM Angebot 21 / des Isomerentyps III gebildet. Abb 1 zeigt die Originalchromatogramme. In Abb 2 wurde aus den Werten der Tabellen I bis III die gesamte Synthesenleistung auch hinsichtlich der Bildung beider Isomerentypen zur Darstellung gebracht. Auch hier sieht man, wie durch die höhere Leistung der Pgb Deaminase im Blute P eine vermehrte Bildung von Porphyrinen des Typs III resultiert. Die gesteigerte Aktivität der porphyrinbildenden Fermente wirkt also im Sinne eines Kompensationsmechanismus.

Discussion

Die Frage ist, wie dieser Kompensationsmechanismus zustande kommt. Kann der Defekt der Isomerase und die gesteigerte Aktivität der porphyrinbildenden Fermente im Sinne einer einheitlichen Störung aufgefaßt werden? Unsere jetzigen und früheren Befunde haben ergeben, daß sowohl die δ -ALAD wie die Pgb. Deaminase in den Erythrocyten des Kranken mit Güntherscher Porphyrin erhöht sind. Wir kommen zu einem Verständnis dieser Tatsache wenn wir die Vorstellung von JACOB und MOYON (5) zu Grunde legen wonach mehrere Strukturgene einer Steuerung

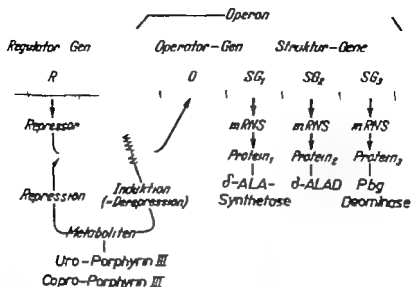


Abb. 3

durch ein Operatorgen unterliegen. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß mehrere Strukturgene zu einem Operon vereinigt sind, welches durch ein Operatorgen gesteuert wird. Das Operatorgen unterliegt der Einwirkung eines Repressors bzw. Induktors über ein Regulatorgen. Durch Metaboliten kann die Wirksamkeit des Repressors gehemmt oder in Gang gesetzt werden. Nehmen wir an, daß Uro- oder Coproporphyrin vom Typ III ein solcher den Repressor beeinflussender Metabolit sei, so würde die normale Bildung von Typ III normalerweise eine Repression des Operatorgens bewirken. Wird aber infolge des Isomerasedefekts die Bildung der Porphyrine vom Typ III vermindert, so würde die Hemmwirkung des Repressors vermindert und es käme dann zu einer gesteigerten Wirkung der Strukturgene des Operons. In unserem Falle würde dadurch die Synthese der Porphyrinenzyme gesteigert. Tatsächlich wurde von uns eine gesteigerte Aktivität der δ -ALAD und der Pbg-Deaminase nachgewiesen. Wahrscheinlich ist auch das Ferment des 1. Schrittes der Porphyrinsynthese in seiner Aktivität gesteigert, denn nur so kann man die vermehrte Anflutung der Porphyrin vorstufen in vivo bei der Güntherschen Porphyrä verstehen. Wir dürfen also in der Zeichnung anstelle von SG₁ das Gen für die δ -Aminolävulinat-Synthetase anstelle von SG₃ das Gen

für die δ -ALAD und anstelle von SG₂ das Gen für die Pbg-Deaminase einsetzen. Es ist nach diesen Vorstellungen wahrscheinlich, daß diese drei Fermente (und vielleicht auch noch die folgenden der Kette) zu einem gemeinsamen Operon gehören. Man sieht, daß nach dieser Theorie der Isomerasedefekt zu einer gesteigerten Synthese der Porphyrine führen muß. Natürlich könnte auch das Uroporphyrin I als Induktor wirken. Mit diesen Vorstellungen sind die verschiedenen bei der Güntherschen Porphyrin beobachteten Erscheinungen auf eine einzige Ursache zurückgeführt, was sehr befriedigend ist.

Zusammenfassung

Synthesversuche mit Bl. hämolytaten von Gesunden und dem eines Kranken mit Güntherscher Porphyrin zeigen, daß bei dieser Krankheit neben dem Defekt der Isomerase eine gesteigerte Leistung der Porphobilinogen-Deaminase vorliegt. Diese – zusammen mit der früher nachgewiesenen Steigerung der δ -Aminolävulinat-Dehydratase – ist im Sinne eines Kompensationsmechanismus wirksam, welcher trotz des vorhandenen Defekts der Isomerase zu einer mehr oder weniger genügenden Synthese des Isomertyps III und damit der Hämoglobinsynthese führt. Die Ursache dieser gesteigerten Fermentfunktionen wird anhand der von JACOB und MOYON entwickelten Vorstellungen über die gemeinsame Steuerung mehrerer Strukturgene diskutiert.

Summary

Investigation of the *in vitro* synthesis of blood haemolytate in healthy subjects and patient with Günther's porphyria shows that in this disease there is not only isomerase deficiency but also increased production of porphobilinogen deaminase. Together with the previously demonstrated increase in δ -aminolävulinic acid dehydratase this acts as a compensation mechanism which, despite the lack of isomerase leads to more or less adequate synthesis of type III haem and therefore also of haemoglobin. The cause of this increased enzyme function is discussed in relation to the theory of the control of several linked structural genes propounded by JACOB and MOYON.

Résumé

Des essais de synthèse à l'aide de sang hémolysé de personnes saines et de malades souffrant de porphyrie de Günther démontrent qu'il existe à côté d'un manque d'isomérase une activité accrue de la déaminase d'porphobilinogène. Celle-ci agit avec l'augmentation de la déhydratase de l'acide δ -aminolévulinique démontre antérieurement en tant que mécanisme compensatoire qui permet malgré le manque d'isomérase une synthèse plus ou moins suffisante de l'isomère de type III et par là de l'hémoglobine. La cause de l'augmentation de ces activités est discutée à l'aide des conceptions développées par JACOB et MOYON sur le réglage en commun de plusieurs gènes de structure.

Literatur

1. GOLDBERG, A. AND RINGBLOM, C. Diseases of porphyrin-metabolism (Thomas, Springfield 1962).
2. HELLMAYER, L.; CLOTTEN, R. KURZ L. MERKER, H. FARFA, C. A. UND WEIZEL, H. F. Porphyria erythropoetica congenita Günther. Dtsch. med. Wschr. 2449 (1963)
3. HELLMAYER, L. CLOTTEN, R. UND HELLMAYER, L. Die Störungen der Hämoglobinsynthese (Thieme 1964)
4. HOLZER, H. Intracelluläre Regulation des Stoffwechsels. Naturwissenschaften 1963, 260
5. JACOB, F. AND MONOD, J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. J. molec. Biol. 3, 318 (1961)
6. W. TRON, C. J. RICHZ, W. TADDEI, L. BORSCHMANN, J. UND CARDINAL, R. Ein vererbter Control-Gen-Mechanismus für die exzessive Produktion von Typ I und Typ III - Porphyrinen bei kongenitaler erythropoetischer Porphyrie. Proc. Acad. Sci. 52, 478 (1964)

Adress der Autoren: Prof. Dr. L. Hellmayer und Doz. Dr. R. Clotten, Med. Univ.-Klinik, Hauptstrasse 55, 78 Freiburg i. Br. (Deutschland)

Medical Clinic of the University of Perugia (Italy)
(Director: Prof. PAOLO LARIZZA)

Studies on the Tetrahydrofolic Acid Dependent Enzyme System in Human Leukocytes*

By F. GRIGNANI, M. MARTELLI, M. TONATO AND A. COLOMBA

In the last few years the enzyme system dependent on folic co-enzymes has been investigated in bacteria and animal tissues. Recently studies on the behavior of some of these enzymes in human normal and leukaemic leukocytes were carried out** (2-4 8-9 18-22)

In both normal and leukaemic cells the following enzymes have been detected: 1. N_{10} Formylsynthetase (2, 3, 4 18, 8) 2. Methylene THFA dehydrogenase (2 18, 8) 3. Serine hydroxymethylase (2) 4. Cyclohydrolase (9) N_{10} Formyl THFA deacylase (3) was also studied and proved to be unmeasurable in circulating blood cells 5-Formyl isomerase (18) is present in minimal amounts.

All these enzymes belong to the C_1 -fragment transporting system and are connected with the C_1 sources and mutually linked according to the scheme of fig. 1. More detailed researches have been accomplished on the following enzymes: methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase: quantitatively the results achieved by BERTINO et al. (2) WILMANYS (18) and GRIGNANI et al. (8) were roughly similar. As a rule the enzymatic activity depending on THFA is higher in the blastic cells of acute leukaemia than in mature granulocytes of normal subjects.

In acute and chronic myelocytic leukaemia GRIGNANI et al. (8) and WILMANYS (18) observed a progressive fall of the enzymatic ac-

Studies supported by a grant of Consiglio Nazionale delle Ricerche

The following abbreviations have been used: AICAR 5-aminoimidazole 4-carboxamide ribotide; ATP Adenosine 3-triphosphate; dUMP Deoxyuridine-5-mono-phosphate; GAR Glycinamide ribotide; GMP 6-mercapto-purine; NADP Nicotinamideadenine dinucleotide phosphate; TCA Trichloroacetic acid; THFA Tetrahydrofolic acid; TRIS Tris hydroxyethylaminomethane; AL Acute leukaemia; CLL Chronic lymphocytic leukaemia; CML Chronic myelocytic leukaemia.

tivity of methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase parallel with the improvement of the haematologic conditions and namely with the disappearance of nucleolated cells. So far no systematic researches on other diseases have been carried out. BERTINO *et al* (4) suggested that in infectious mononucleosis the N_{10} -formyl THFA synthetase activity is markedly high. WILMANN (21) observed that the immature cells of normal marrow contain formyl-THFA synthetase and N_{10} , N_{10} methylene THFA dehydrogenase in higher concentrations than normal circulating cells.

N_{10} -formyl THFA synthetase has been partially purified from erythrocytes (3). In red blood cells was also demonstrated the presence of serine hydroxymethylase and methylene THFA dehydrogenase (3, 18, 8). The enzymatic activity is markedly higher in reticulocytes than in mature red blood cells. Chicken nucleated erythrocytes were characterized by a N_{10} formyl THFA synthetase and N_{10} , N_{10} -methylene THFA dehydrogenase content higher than in mature human erythrocytes (8).

The research so far carried out on the behavior of THFA dependent enzymes is partial and fragmentary. In our present investigations we aimed at studying the behavior of most of the enzymes shown in fig. 1 in normal and leukaemic leukocytes. The activity of these enzymes was examined following the course of the disease, and compared to that of normal human liver obtained by surgical biopsy.

Methods

a) Clinical Material

Our investigations were performed on normal erythrocytes and isolated leukocytes of peripheral blood of normal and leukaemic subjects. In the latter repeated assays were made at different intervals, in relation to the progress of the disease and to the antineoplastic therapy. Studies on the activity of enzymes connected with THFA in liver tissue of some normal subjects and in malignant lymphomas were also carried out.

b) Leukocyte Isolation and Lysoate Preparation

Leukocyte isolation was performed following a modification of a method described elsewhere (9). 5% ethylene-diaminetetraacetic acid, Mg salt, was used as anticoagulant, in the proportion of 1 ml per 9 ml of blood.

Sedimentation of the collected blood was allowed to proceed in siliconized glass for about 60 minutes. The supernatant plasma, containing most leukocytes, was centrifuged at 120 g. m. for 10 minutes. Leukocytes precipitate was again suspended in isotonic sodium chloride solution. The cellular suspension, after leukocyte counting, was centrifuged at 120 g. m. for 10 min. The limpid supernatant fluid was removed and precipitate again suspended in a amount of 0.01 M phosphate buffer pH 7 equal to that of the aspirated supernatant fraction. The cytolysate was then homogenized in

sion-glass Potter homogenizer for 10 minutes. After 15 minutes, the lysate was centrifuged for 20 minutes at 10,000 p. m. in refrigerated centrifuge and the supernatant fluid utilized for enzymatic assays. All the operations concerning leukocyte isolation and lysate preparation were conducted at 4°C.

c) Preparation of Lymphatic Glands and Liver Homogenate

These fragments obtained with surgical biopsy were homogenized in sion-glass Potter homogenizer for 15 minutes with mM K phosphate buffer pH 7. After 15 minutes at 4°C, the homogenate was centrifuged at 10,000 p. m. for 15 minutes and the supernatant fluid was then utilized for enzymatic determinations.

d) Reagents

dl L-tetrahydrofolic acid, formylmethylglutamic acid, barium salt, L-serine and glutamic acid were provided by the Sigma Chem. Company. Calcium salt of 5-formyl-THFA was supplied by the Lederle Laboratories. dl N^6 , N^8 -methylene-THFA was prepared following Tabor and Wyngarden technique (16).

e) Enzyme Assays

Our researches were aimed to the following enzymes depending on THFA: 1. N^6 -formyl synthetase; 2. N^6 , N^8 -methylene-THFA dehydrogenase; 3. serine hydroxymethylase; 4. cyclohydrolyase; 5. N^6 -formyl isomerase; 6. formimino-THFA transference; 7. N^6 -formyl-THFA transformylase.

1. N^6 -formyl-THFA synthetase (or formate activating enzyme, or formylase) was assayed following modification of the WILMANN (18) technique. The 10-formyl-THFA formed in the enzymatic reaction is converted to 5-10-methylene-THFA in acid medium.

Assay composition	TRIS buffer pH 7.4	100 μ Mol
	2 mercapto-ethanol	20 μ Mol
	Na formate	100 μ Mol
	Mg Cl_2	40 μ Mol
	NH Cl	20 μ Mol
	THFA	2.7 μ Mol
	ATP	10 μ Mol
	lysate equal to	10 cells
	H ₂ O to	volume of 2 ml

The assay mixture was incubated in water bath at 37°C for 20 minutes under petroleum ether. At 0 min and 20 min 0.5 ml of the mixture were deproteinized and acidified with 0.25 ml of 5 M HClO₄. After 15 min at room temperature the denaturated proteins were removed by centrifugation and the supernatant fluid brought to 2 ml with H₂O.

2. N^6 , N^8 -methylene-THFA dehydrogenase. The method utilized was modification of the technique followed by WILMANN (18) BERTINO et al. (7) and LEROUX et al. (8). It is based on the enzymatic formation of N^6 , N^8 -methylene-THFA stabilized through acidification.

Assay composition	K phosphate buffer pH 7.4	200 μ Mol
	2 mercapto-ethanol	20 μ Mol
	HCHO	10 μ Mol
	THFA	2.7 μ Mol

tivity of methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase parallel with the improvement of the haematologic conditions and namely with the disappearance of nucleolated cells. So far no systematic researches on other diseases have been carried out. BERTINO *et al.* (4) suggested that in infectious mononucleosis the N_{10} formyl THFA synthetase activity is markedly high. WILMANN (21) observed that the immature cells of normal marrow contain formyl THFA synthetase and N_5 , N_{10} methylene THFA dehydrogenase in higher concentrations than normal circulating cells.

N_{10} formyl THFA synthetase has been partially purified from erythrocytes (3). In red blood cells was also demonstrated the presence of serine hydroxymethylase and methylene THFA dehydrogenase (3, 18, 8). The enzymatic activity is markedly higher in reticulocytes than in mature red blood cells. Chicken nucleated erythrocytes were characterized by a N_{10} -formyl THFA synthetase and N_5 , N_{10} methylene THFA dehydrogenase content higher than in mature human erythrocytes (8).

The research so far carried out on the behavior of THFA dependent enzymes is partial and fragmentary. In our present investigations we aimed at studying the behavior of most of the enzymes shown in fig. 1 in normal and leukaemic leukocytes. The activity of these enzymes was examined following the course of the disease and compared to that of normal human liver obtained by surgical biopsy.

Methods

a) General Method

Our investigations were performed on normal erythrocytes and isolated leukocytes of peripheral blood of normal and leukaemic subjects. In the latter repeated assays were made at different intervals, in relation to the progress of the disease and to the antileukemic therapy. Studies on the activity of enzymes connected with THFA in liver tissue of some normal subjects and in malignant lymphomas were also carried out.

b) Leukocyte Isolation and Lysate Preparation

Leukocyte isolation was performed following modification of method described elsewhere (9). 5-Ethylene-diaminetetraacetic acid, Mg salt, was used as anticoagulant, in the proportion of 1 ml per 9 ml of blood.

Sedimentation of the collected blood was allowed to proceed in siliconized glass for about 60 minutes. The supernatant plasma, containing most leukocytes, was centrifuged at 120 \times g. for 10 minutes. Leukocytes precipitate was again suspended in formal sodium chloride solution. The cellular suspension, after leukocyte counting, was centrifuged 120 \times g. for 10 min. The liquid supernatant fluid was removed and precipitate again suspended in an amount of 0.01 M phosphate buffer pH 7 equal to that of the separated supernatant fraction. The cytolysate was then homogenized in a

7 N_6 -formyl THFA transferase The enzyme was assayed according to SCLAVAN¹ method (15). The tetrahydrofolate obtained from the N_6 -formyl THFA was quantitatively converted into p-aminobenzoic-glutamic acid and was assayed following BRATTON AND MARSHALL (5) method for arylamine.

Assay composition: K phosphate buffer pH 6.0 330 μ Mol K₂ glutamate pH 6.0 34 μ Mol N_6 -formyl-THFA 0.26 μ Mol lysate containing up to 1×10^6 cells H_2O to final volume of 3.5 ml.

After an incubation at 37° C for an hour the reaction was stopped by adding 1.5 ml of 10% TCA. Denaturated protein was then precipitated by centrifugation and BRATTON AND MARSHALL reagents added to the supernatant fluid. The arylamine produced corresponds stoichiometrically to the THFA formed in the incubation mixture. Two controls without N_6 -formyl THFA and enzyme were carried out for every assay.

Hexokinase was assayed according to GRONAU AND LOEBL (7). **Lactic dehydrogenase** according to BERGMAN ET AL. (1). **glucose-6-P dehydrogenase** according to HORRIGER AND HOLZNER (11). **succinic dehydrogenase** according to KUBOWITZ AND LUTTICH (12).

All the determinations were performed by means of Beckman DU spectrophotometer in cuvettes of 1 cm light path. Only succinic dehydrogenase was assayed in Warburg-respirometer. One unit is defined as the amount of enzyme which causes in 1 minute the disappearance of 1 μ Mol of substrate or the formation of similar amount of reaction product. Specific activity is defined as units per mg of proteins and/or per 10⁶ cells.

In reactions catalyzed by N_6 -formyl synthetase, methylene THFA dehydrogenase, formamido-THFA transferase and cyclohydrolase for the calculation it was utilized the molar extinction coefficient of N_6 -methylene THFA (24.9×10^4 at acid pH and at 355 nm for cyclohydrolase; 24.9×10^4 at acid pH and at 350 nm for the other enzymes (15)).

For the N_6 -formyl isomerase the unit was arbitrarily defined as the quantity of enzyme which causes Δ extinction of 0.001 in one minute at 295 nm.

Protein was determined following WARBURG AND CHRISTIAN¹ method (17) based on the different coefficients of extinction of proteins at 260 and 280 nm.

Table I

Levels of THFA-dependent enzymes and of hexokinase, lactic dehydrogenase, glucose-6-P dehydrogenase and succinic dehydrogenase in normal human leukocytes (μ Mol $\text{min}^{-1}/10^6$ cells)

Enzymes	No. of subjects	mean values \pm s.e.
Formyl THFA synthetase	10	1.46 \pm 0.40
Methylene THFA dehydrogenase	10	0.905 \pm 0.15
Serine hydroxymethylase	10	1.064 \pm 0.19
Cyclohydrolase	20	1.85 \pm 0.156
Formamido-THFA transferase	10	0.00
Formyl THFA transferase	10	0.00
Formyl THFA isomerase	10	0.00
Hexokinase	10	11.2 \pm 1.2
Lactic dehydrogenase	10	300.0 \pm 45.0
Glucose-6-P dehydrogenase	10	109.0 \pm 11.1
Succinic dehydrogenase	10	1.07 \pm 0.9

Table II

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of chronic myelocytic leukaemia ($\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1}/10^{10}$ cells).

Subjects	Formyl-THFA synthetase	Methylene-THFA dehydrogenase	Serine hydroxymethylase	Cyclohydrolase	Formimino-THFA transferase Formyl-THFA transferase Formyl-THFA isomerase
B. M.					
1	4.07	2.74	2.68	2.84	
2	4.60	2.73	3.36	6.70	
3	5.14	2.39	3.00	4.30	
4	5.67	1.86	2.71	4.80	
5	2.72	1.86	2.57	4.10	
C. A.					
1	3.36	2.04	3.40	4.40	
2	3.54	1.15	2.48	2.80	
B. L.					
1	2.21	1.06	1.68	2.51	
2	2.83	1.59	2.12	2.20	
3	2.45	1.33	1.68	3.70	no activity
F. S.					
1	1.51	0.89	1.42	2.20	
2	0.67	1.15	1.79	4.10	
B. C.					
1	0.78	1.10	1.28	2.96	
2	0.61	0.47	0.53	1.30	
3	1.93	1.06	1.24	2.40	
T. A.					
1	2.09	1.10	0.93	3.40	
S. G.					
1	0.70	0.57	0.57	1.40	

Results

The activity of the THFA dependent enzymes observed in normal leukocytes is summarized in table I. The methods we applied made it possible to demonstrate only the activity of 4 out of 7 enzymes investigated. Formyl THFA isomerase, formyl THFA transferase and formimino-THFA transferase must be regarded as absent in normal leukocytes or present in such a low concentration requiring more sensitive techniques and/or preliminary purification processes. Conversely, formyl THFA synthetase, methylene THFA dehydrogenase, cyclohydrolase and serine hydroxymethylase were present in measurable amount, of about the same magnitude.

The enzymatic content proved to be highly variable according to the case. Attempts to correlate the activity of enzymes dependent from THFA with some parameters such as the leukocytes number, the leukocyte differential count and the sedimentation rate of erythrocytes failed.

In the single cases, the cyclohydrolase showed a slightly higher activity followed by the formyl THFA synthetase, serine hydro-

Table III

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of acute leukaemia ($\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1}/10^6$ cells)

Subjects	10-Formyl-THFA synthetase	Methylene- THFA dehydrogenase	Serine hydroxy- methylase	Cycto- hydrolyase	Formimino-THFA transferrase Formyl-THFA transference Formyl-THFA aminotransferase
S. D. 1	1.77	1.67	2.30	3.33	
2	1.95	1.50	2.12	4.60	
3	3.46	2.56	3.18	4.10	
4	3.72	2.39	3.90	8.50	
5	6.28	3.96	4.86	10.10	
C. E. 1	4.47	2.70	3.00	7.30	
2	4.57	2.62	3.00	8.20	
3	3.28	1.86	2.1	4.98	
4	3.28	2.21	2.70	3.30	
P. V. 1	5.05	2.57	3.72	4.60	
2	6.55	2.48	3.28	3.40	no activity
3	4.82	2.63	4.10	4.10	
T. G. 1	2.58	1.77	2.29	3.30	
2	6.66	2.40	2.90	7.50	
3	5.30	1.91	1.63	3.50	
4	8.80	3.10	2.07	6.90	
L. A. 1	4.40	2.10	1.70		
F. D. 1	1.70	1.60	1.70		
B. G. 1	2.14	0.88	1.30	2.6	
2	3	0.93	1.2	2.7	
3	3.2	1.10	1.04	3.50	
4	3.3	1.38	1.29	2.8	

lymphoblastic leukaemia.

xymethylase and finally by methylene THFA dehydrogenase. Some glycolysis enzymes (hexokinase and lactic-dehydrogenase) and of the pentose shunt (glucose-6-P dehydrogenase) showed an activity of 3 to 100 times higher. The activity of an enzyme of the Krebs cycle instead (succinic dehydrogenase) was not very different from that of THFA-dependent enzymes.

The enzymatic activity observed in chronic myeloid leukaemia is summarized in table II and the most significant cases are outlined in fig. 2 and 3. In table III there are summarized the values obtained in acute leukaemia, some instances are shown in fig. 4 and 5.

The mean values of activity were not calculated since the heterogeneity of cellular population, namely in chronic myeloid leukaemia, makes every case quite different from the other. Moreover in the same case different values were observed after subsequent determinations, in relation to various factors which will be later examined. In leukaemic cells also the highest enzymatic activity was

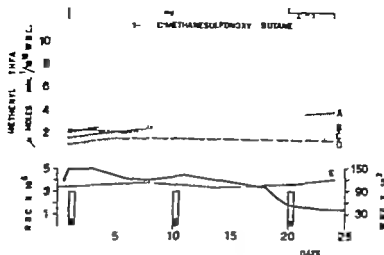


Fig. 2. Level of THFA-dependent enzymes in a case of chronic myelocytic leukaemia. A Cyclohydrolase B N_{10} -formyl-THFA synthetase C Serine hydroxymethylase D N_{5} , N_{10} -methylene THFA dehydrogenase E Red blood cells F White blood cells. Black bars indicate the percentage of blast cells.

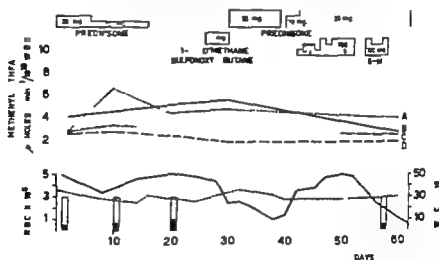


Fig. 3. Level of THFA-dependent enzymes in a case of chronic myelocytic leukaemia. Legend see fig. 2.

found in cyclohydrolase. Only in a few instances of chronic myeloid leukaemia N_{10} -formyl-THFA synthetase activity was predominant. It was also found that the activity of serine hydroxymethylase was slightly higher than that of methylene THFA dehydrogenase. According to the methods used this would appear theoretically im-

possible. Probably the substrate given to the methenyl THFA dehydrogenase by the serine hydroxymethylase was such easier to metabolize than the one obtained chemically from the synthesis of THFA and formaldehyde. Controls executed with the direct method of determination of serine hydroxymethylase gave anyway overlapping results.

The enzymatic content of the heterogenous cellular population in chronic myeloid leukaemia was very often higher than in normal granulocytes (table I and II). The finding was even more evident in the acute phases of chronic myeloid leukaemia and namely in blast cell leukaemia (table III).

Fig 2 to 5 indicate that in both chronic myeloid and acute leukaemia during the course of the disease significant changes of the enzymatic activity occurred. The modification observed were roughly the same for all four enzymes.

From fig 2 to 5 there is no connection between the level of enzymatic activity and the number of circulating leukocytes. Conversely it appears evident that the enzymatic content is correlated in inverse proportion to the degree of maturity of the cell. The highest enzymatic activity was therefore found (fig 5) in those acute cases of leukaemia richer in blastic cells. Parallel with the relapse of the haematologic conditions of the patient, which brought to a peripheral blood picture made exclusively of blastic cells, it was ob-

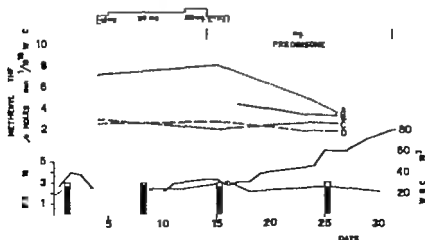


Fig 1 Level of THFA-dependent enzymes in case of acute leukaemia. Legend see fig. 2.

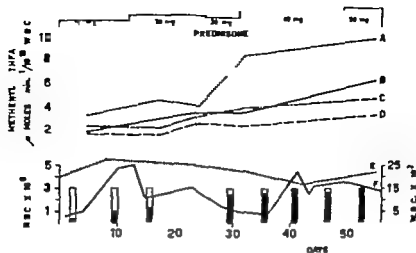


Fig 5. Level of THFA-dependent enzymes in case of acute leukaemia. Legend see fig. 2

served a progressive increase in the activity of the four enzymes (fig 5). A lack of parallelism between change in time of the percent of blastic cells and the enzymatic activity was evidenced in the case reported in fig 4. In this subject the progressive aggravation of the clinical and haematologic situation was accompanied by an evident decrease in the enzymatic activity. It is however likely that this should be correlated with cytostatic therapy. The decrease of the enzymatic activity in fact started after 17 days of treatment with 6-MP and continued under repeated controls even after the discontinuance of the drug. The corticosteroids never proved to affect the enzymatic content. In case outlined in fig 5 the enzymatic activity increased under steroid therapy in relation to the increased number of immature cells. Alkylating agents, such as triethylenephosphoramide and the dimethansulfonoxylbutane acted even indirectly inducing an improvement of the blood picture.

In table IV is summarized the enzymatic activity of lymphocytes (peripheral blood of chronic lymphocytic leukaemia) and of the plasma cells (sternal marrow of multiple myeloma). In these cells was demonstrated the presence of the same enzymes evidenced in normal granulocytes and in the cells of other varieties of leukaemia. The enzymatic activity of lymphocytes proved to be rather poor in relation to the modest cytoplasmatic volume of these cells. Plasma cells instead contained a high quantity of formyl THFA synthetase and methylene THFA dehydrogenase whereas the activity of serine

Table IV

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of chronic lymphocytic leukaemia and in plasma cells (from marrow) ($\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1}/10^6$ cells)

Enzymes	Chronic lymphocytic leukaemia (mean values)	Plasma cells (from marrow)
Formyl THFA synthetase	1.19 ± 0.205	2.7
Methylene THFA dehydrogenase	0.44 ± 0.028	0.81
Serine hydroxymethylase	1.24	1.04
Cyclohydrolase	1.32	1.10
Formimino THFA transference	no activity	
Formyl THFA transference		
Formyl THFA isomerase		

hydroxymethylase and cyclohydrolase was similar to that of normal granulocytes.

In normal human erythrocytes the presence of formyl THFA synthetase and methylene THFA dehydrogenase was demonstrated. The mean values referred to 10^{16} cells were 10 times lower than those of normal white cells. Conversely there were only traces of serine hydroxymethylase. The determination of cyclohydrolase did not provide reliable results owing to the considerable absorption of hemoglobin at 355 nm. In nucleated erythrocytes of chicken formyl THFA synthetase was found in a concentration only slightly lower than that observed in normal human red blood cells. Methylene THFA dehydrogenase showed instead an activity only slightly higher.

Table V

Levels of THFA-dependent enzymes in human erythrocytes, in reticulocytes and in chicken erythrocytes ($\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1}/10^6$ cells).

	Formyl-THFA synthetase	N_5 , N_{10} -methylene-THFA dehydrogenase
Human erythrocytes	89.4 ± 10.4	41 ± 5.06
Human reticulocytes	400	110
Chicken erythrocytes	270	56

In the lysate of an erythrocytic human preparation containing 60% of reticulocytes the enzymatic activity was more elevated than that of nucleated chicken erythrocytes (table V).

The enzymes depending on THFA were examined even in human liver tissue and in lymph nodes of some subjects suffering from malignant lymphomas (table VI).

Table VI

Levels of THFA-dependent enzymes in human normal liver and in malignant lymphomas. Mean values ($\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1}/\text{mg}$ protein).

Enzymes	Human Liver	Malignant lymphomas
Formyl THFA synthetase	23.7	5.8
N_5, N_{10} -methylene THFA dehydrogenase	22.0	3.9
Serine hydroxymethylase	31.2	4.9
Cyclohydrolase	26.5	8.5
Formimino THFA transferase	21.5	0.0
5-Formyl THFA isomerase	4.2	0.0

Units as defined under Methods

In normal human liver all the enzymes were present with a markedly high and almost overlapping activity. In lymphatic tissue instead we found only the enzymes present in leukocytes. Among them the activity of 10-formyl THFA synthetase proved to be markedly higher.

Conclusions

Our investigations constitute the first approach to the systematic study of enzymes depending on THFA in normal and leukaemic leukocytes. Whereas in normal human liver all the folate enzymes so far known were easily demonstrated and assayed, in leukocytes only some of them are found in detectable quantities, suitable for the methods applied. Though it is impossible to state with certainty that nonmeasurable enzymes are absent from white cells, it is likely that they are present in markedly low amounts.

Since the most active enzymes were cyclohydrolase, formyl-THFA synthetase, methylene THFA dehydrogenase and serine hydroxymethylase, the most effective sources of C_1 radicals for the THFA pool in leukocytes are the formate (and therefore some purines and glycine) formaldehyde and serine. On the contrary it could be assumed that the formimino groups resulting from histidine and the purines have a poor utilization in leukocytes. The behavior of formyl THFA transferase, N_5 -formyl THFA isomerase indicates that the utilization of the formyl group of formyl-glutamate is not significant in normal and leukaemic white cells. WILMANS (18) however succeeded in evidencing a modest amount of formyl isomerase in leukocytes. Such reaction is worth further investigations since it involves folinic acid, the only stable compound of THFA which could be used for the treatment of some forms of megaloblas-

tic anemia and as an antidote in amethopterin poisoning. The active enzymes of leukocytes allow for the formation of 3 compounds acting as donors of C_1 fragments for important synthesis reactions, namely 10-formyl THFA, N_5 , N_{10} -methenyl THFA and N_5 , N_{10} methylene THFA (fig. 1).

These substances permit the synthesis respectively of formimidocarbonylamideribotide, formylglycinamide ribotide and of the methyl group of methionine. Further investigation should clarify the behavior of these three reactions in human leukocytes.

Formyl THFA synthetase, methylene THFA dehydrogenase, cyclohydrolase and serine hydroxymethylase show an activity of the same magnitude in leukocytes. The enzymatic activity is higher in blast cells of leukemia. Such finding is in accordance with what was reported, only as regards some of the enzymes we have examined, by BERTINO et al. (2) WILMANNS (18-22) and GRIGNANI et al. (8).

Some findings of WILMANNS (21) and BERTINO et al. (2) suggest that the enzymatic hyperactivity should not be correlated with the malignancy of leukaemic cells but only with their greater immaturity. Indeed the preparation obtained from marrow blood of normal subjects showed an enzymatic content higher than that of cells obtained from peripheral blood. On the other hand, we have observed that the enzymatic activity of reticulocytes is higher than that of mature erythrocytes.

The influence of therapies on THFA enzymes is as a rule indirect. The enzymatic cellular content decreases owing to the progressive replacement of immature cell population with a more mature one. However in the case of 6-Mercapto purine, it was demonstrated a direct inhibition of formyl THFA synthetase and methylene THFA dehydrogenase (19-20). Moreover in one of our patients the enzymatic fall occurred immediately after treatment with 6-MP. The study of the influence of antileukemic agents on the activity of THFA dependent enzymes is of outstanding practical importance. It could be possible in fact the working out an *in vitro* sensibility assay in order to institute an effective therapy.

Summary

In normal and leukaemic leukocytes, of the 7 tetrahydrofolic acid (THFA) enzymes examined only four were evidenced: formyl-THFA synthetase, methylene-THFA dehydrogenase, serine hydroxymethylase and cyclohydrolase. The activity of these enzymes

is of the same magnitude in normal cells. In blastic cells of both chronic myeloid and acute leukaemia the enzymatic content is higher than that of mature cells. In leukaemic subjects it decreases therefore with the improvement of the peripheral blood picture. In the lymph nodes of some subjects suffering from malignant lymphomas the same enzymes are found as in leucocytes. In human liver tissue instead all the THFA dependent enzymes were evidenced.

Résumé

Nous n'avons pu démontrer que 4 des 7 enzymes de l'acide tétrahydrofolique (ATHF) dans des leucocytes normaux et leucémiques: la synthétase d'ATHF formyl, la déhydrogénase d'ATHF méthyle, la sérine-hydrométhylase et la cyclohydrolase. Ces enzymes ont la même activité dans les cellules normales. Dans les cellules immatures des leucémies chroniques et aiguës, le contenu d'enzymes est plus grand que dans les cellules matures. Il diminue avec l'amélioration de la formule sanguine. Dans les ganglions lymphatiques de quelques malades ayant des lymphadénopathies malignes se trouvent les mêmes enzymes que dans les leucocytes. Dans le tissu hépatique de l'homme, tous les enzymes dépendant de l'ATHF ont pu être mis en évidence.

Zusammenfassung

In normalen und leukämischen Leukocyten konnten nur 4 der 7 Enzyme der Tetrahydrofolsäure (THFA) nachgewiesen werden: Formyl-THFA-Synthetase, Methyl-THFA-Dehydrogenase, Serin-Hydromethylase und Cyclohydrolase. In normalen Zellen weisen diese Enzyme dieselbe Aktivität auf. In Blasten chronischer und akuter Leukämien ist der Enzymgehalt höher als in reifen Zellen. Er nimmt bei Besserung des peripheren hämatologischen Befundes ab. In Lymphknoten von Patienten mit malignen Lymphomen finden sich dieselben Enzyme wie in den Leukocyten. In menschlichem Lebergewebe konnten alle THFA-abhängigen Enzyme nachgewiesen werden.

References

1. BERTHOUD, G.; BOLTER, H. J.; BUTCHER, T.; CZOR, R.; GARRADE, A. H.; MEYER ARNDT, E. and FLEISHER, G. Diphosphofructose-aldolase, Phosphoglycerinaldehyde-dehydrogenase, Milchsäure-dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat Kinasen aus Kaninchen-Muskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).
2. BERTHOUD, J. R.; SELZER, R.; FREEMAN, M.; ALEWY, A.; ALBRECHT, M.; GARRO, B. W. and HICKENESS, F. M. Studies on normal and leukaemic leucocytes. IV. Tetrahydrofolate-dependent enzyme systems and dihydrofolic reductase. *J. Clin. Invest.* 42, 1899 (1963).
3. BERTHOUD, J. R.; SCHOW, B. and DOWDICK, D. M. Purification and properties of the folic acid activating enzyme from erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 237, 1314 (1962).
4. BERTHOUD, J. R.; SCHOW, B. M. and DOWDICK, D. M. Increased activity of some folic acid enzyme systems in infectious mononucleosis. *Blood* 19, 587 (1962).
5. BRATTON, A. C. and MARSHALL, E. K., J. quoted by: FLAHERTY, J. G. and LEECH, L. N. The enzymes of purine nucleotide synthesis de novo. B. Assay for diaminobenzoyl amines in COLOWICK and KAPLAN. *Methods in Enzymology* Vol. VI, p. 55 (Academic Press, New York 1963). *J. Biol. Chem.* 128, 537 (1939).
6. GRIGNANI, F.; COLOMBA, A.; MASTROSCALA, MARIA; MARTELLI, M. La glicolisi dei leucociti normali e leucemici. *Haematologica* 48, 509 (1963).

7. GRIGUANI, F. and LORER, G. W. Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. *Klin. Woch.* 38: 796 (1960).
8. GRIGUANI, F., MARTELLI, M., COLOTTA, A. Alcune osservazioni sul comportamento degli enzimi del pool del tetraidrofolato nelle cellule ematiche. *Haematologica* 48: 615 (1963).
9. GRIGUANI, F.; MARTELLI, M., COLOTTA, A. and TOMATO, M. Studies on the properties of cyclohydrolase from human leukocytes. *Enzymol. Mol. Clin.* 4: 231 (1964).
10. KAY, L. D., OSMORE, M. J., HATTEL, Y. and HEDBERG, F. M. The enzymatic conversion of N_5 -formyl-tetrahydrofolic acid (folinic acid) to N_{10} -formyl tetrahydrofolic acid. *J. biol. Chem.* 235: 194 (1960).
11. KORNBERG, B. and HORWICKER, B. L. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase; in COLOWICK's and KAPLAN's *Methods in Enzymology* Vol. I, p. 373 (Academic Press, New York 1955).
12. KUNOWITZ, F. and LESTER, W. Zusammenfassung, Spaltung und Reinigung der Carboxylase. *Biochem. Z.* 307: 170 (1941).
13. RANDOWITZ, J. C. and PRICER, W. E., Jr. quoted by TAYLOR and WYNGARDEN. *J. Amer. chem. Soc.* 78: 5705 (1956).
14. SCHIMMACK, K. G. and HEDBERG, F. M. Serine hydroxymethylase in COLOWICK's and KAPLAN's *Methods in Enzymology* Vol. V p. 638 (Academic Press, New York 1962).
15. SILVERMAN, M. N_5 -formyl-tetrahydrofolic acid-glutamic acid transformylase from hog liver in COLOWICK's and KAPLAN's *Methods in Enzymology* Vol. V p. 790 (Academic Press, New York 1962).
16. TAYLOR, H. and WYNGARDEN, L. The enzymatic formation of formiminotetrahydrofolic acid, 5-10-methenyl-tetrahydrofolic acid and formyl-tetrahydrofolic acid in the metabolism of formimino-glutamic acid. *J. biol. Chem.* 234: 1830 (1959).
17. WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. quoted by LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins. IV Protein estimation by ultraviolet absorption in COLOWICK's and KAPLAN's *Methods in Enzymology* Vol. VI, p. 55 (Academic Press, New York 1963). *Biochem. Z.* 310: 384 (1941).
18. WILKINSON, W. Die tetrahydrofolatunabhängige Aktivierung von Einkohlenstoff-substraten in normalen und pathologischen weissen Blutzellen. *Klin. Woch.* 33: 884 (1961).
19. WILKINSON, W. Zum Wirkungsmechanismus von 6-Mercaptopurin. *Klin. Woch.* 40: 1170 (1962).
20. WILKINSON, W. Indikation zur Behandlung akuter Leukämien mit 6-Mercaptopurin auf biochemischer Grundlage. *Dtsch. med. Woch.* 88: 900 (1963).
21. WILKINSON, W. Der Stoffwechsel der Einkohlenstoffeinheiten in den unreifen Vorstufen normaler Leukozyten. *Med. Welt* 2670 (1963).
22. WILKINSON, W. and JAEGER, L. Die Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für die normale und pathologische Reifung von Blutzellen. *Klin. Woch.* 41: 1077 (1963).

Authors' address: Drs. F. Griguani, M. Martelli, M. Tomato and A. Colotta, Medical Clinic, University of Perugia, Perugia (Italy).

Institut für Hämatologie und Bluttransfusion in Prag (Vorstand: Prof. J. Hořejší);
I. Interne Klinik der Medizinischen Fakultät der Karlsuniversität in Prag (Vorstand:
Prof. V. Horsko)

Stoffwechselveränderungen in Erythrozyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit

VON V. BRABEC, J. BICANOVÁ, B. FRIEDMANN, M. KOUT
L. MÍRČEVOVÁ, J. PALEK, M. VOPATOVÁ UND V. VOLEK

Der Mechanismus der gesteigerten Hämolyse bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit wurde bisher nicht genügend aufgeklärt. Obwohl der Zusammenhang zwischen der Umhüllung der Erythrozyten mit inkompletten Antikörpern und ihrem vorzeitigen Absterben unzweifelhaft zu sein scheint, ist diese Beziehung in Wirklichkeit nicht eindeutig. Dies folgt aus der klinischen Erfahrung, daß die Lebensdauer sensibilisierter Erythrozyten bei einigen Patienten zwar stark verkürzt ist, daß sie jedoch bei anderen verhältnismäßig lang ist und sogar nach der Behandlung normal sein kann, obwohl die Sensibilisierung der Erythrozyten andauert. Ungeklärt bleibt auch die Frage, ob die Sensibilisierung der Erythrozyten ihren Stoffwechsel irgendwie beeinflußt, z. B. durch die Hemmung einiger Stromaenzyme. Mit diesem Problem befaßten sich STORTI *et al.* (21). Diese Verfasser stellten *in vitro* eine Herabsetzung der Glykolyse bei Erythrozyten fest, die durch inkomplette Antikörper künstlich sensibilisiert waren. Untersuchungen der Glykolyse von Erythrozyten bei Patienten mit autoimmunen hämolytischen Krankheiten brachten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse (11, 15, 18).

Da das Problem der Veränderung des Erythrozytenstoffwechsels bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit noch nicht gelöst ist und die Hinweise aus dem Schrifttum unvollständig sind, führten die Verfasser bei 20 an dieser Krankheit leidenden Patienten einige biochemische Untersuchungen durch.

Material und Methoden

Das Diagnose der idiopathischen autoimmunen hämolytischen Krankheit wurde anhand der klinischen und Laboratoriumsanalyse gestellt. In der ersten Gruppe (I) den sich 14 Patienten mit einem verschiedenen Hyperhämolysegrad. Das zweite umfaßte 11 Patienten, bei denen die Hyperhämolyse nach der Behandlung zur- rückkehrte. Bei 5 Patienten blieb der direkte Antiglobulintest positiv (Gruppe II) bei weiteren 6 Personen wurde eine komplette Remission erzielt, wobei diese post-Reaktion verschwand (Gruppe IIb). 5 Patienten wurden im Verlauf der Krankheitsdauer mehrmals untersucht. 2 Patientinnen (Nr. 13 und 14) wurden anhand ihres Krankheitsstadiums in die Gruppen I und II eingereiht und zwei weitere (Nr. 11 und 12) in Gruppen I und IIb. Eine Patientin (Nr. 17) kam in die Gruppen II und IIb.

Das Blutbild wurde auf die übliche Weise untersucht. Die direkte Antiglobulin- reaktion wurde serometrisch angeführt.

Die Erythrozytenlebensdauer (zum Zeitpunkt der biochemischen Untersuchung wurde mittels Radiochrom untersucht. Die Blutproben wurden mit $70\mu\text{Ci }^{51}\text{Cr}$ in- zuriert und vor der Transfusion nicht gewaschen. Als 100% Wert wurde eine Blutprobe betrachtet, die 24 Stunden nach der Transfusion entnommen wurde, betrachtet. Die halbe werden als Halbwertszeiten der Erythrozytenlebensdauer angeführt, wobei die halbwertszeiten 24 und 34 Tage betragen.

Zur biochemischen Untersuchung wurden die Blutproben von Leukozyten und Thrombozyten befreit (24).

Die Aktivität der Erythrozytenphosphatase wurde serometrisch nach AMON (1) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in $\mu\text{l CO}_2/0,1 \text{ ml Erythrozyten}/1 \text{ Std.}$ ausgedrückt.

Bei der Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase der Erythrozyten wurde die Methode nach KING ARMSTRONG in KOTLOCK'S Modifikation angewandt (15). Eine Phosphataseeinheit ist diejenige Enzymmenge in 100 ml Erythrozyten, welche in standarden Reaktionen aus dem Substrat - Natriumphosphat - 1 mg Phenol/Std freisetzt.

Die glykolytische Aktivität der Erythrozyten wurde auf serometrische Weise am Warburg bestimmt. Die Ergebnisse wurden in $\mu\text{l CO}_2/1 \text{ ml Erythrozyten}/3 \text{ Std.}$ In- kubation ausgedrückt. (17)

Der Sauerstoffverbrauch der Erythrozyten in Gegenwart von Methylenblau wurde am Warburg bei 38°C bestimmt. Die Ergebnisse wurden in $\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml Erythrozyten}/1 \text{ Std.}$ Inkubation ausgedrückt (17).

Das reduzierte Glutathion der Erythrozyten in $\text{mg}/100 \text{ ml}$ wurde mittels der Nitro- blue-Methode nach GRUNERT und PHILLIPS (9) bestimmt.

Die Stabilität des reduzierten Glutathions bei der Inkubation mit Acetylphenylhydra- zine wurde nach BUTLER (4) ermittelt in einem glukosehaltigen Medium nach SEXTON (22).

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase wurde mittels einer Modifikation der Methode nach KORNBERG und HORSCHER (14) bestimmt. Details werden in einer weiteren Mitteilung angegeben (24).

Die ATP-ADP-3,3-Diaphosphorylase und saure Phosphatase der Erythrozyten wur- den chromatographisch auf DOWEX 1 $\times 8 \text{ Cl}$ mit der Methode nach BARTLETT (2) be- stimmt. Die einzelnen Substanzen wurden in den Fraktionen nach der Gradienten- destillation durch die spektrophotometrische Bestimmung des Adeningehaltes, durch die Bestim- mung der Ribose mittels der Orcinolreaktion (7) sowie des Gesamtphosphors nach VAN-SOESTEROW in der Modifikation von Bartlett (3) ermittelt. Organische Phosphate den sowohl im frischen Blut als auch nach der Inkubation des Heparinblutes bei 37°C für eine Dauer von 8 und 24 Stunden in der Gegenwart eines Glukoseüberschusses bestimmt. Die Ergebnisse sind im Mikromol je 100 ml Erythrozyten ausgedrückt.

Außer der Beständigkeit des reduzierten Glutathions und der Phosphatasebestim- mung wurden alle Ergebnisse mittels des statistischen t -Testes ausgewertet.

Ergebnisse

Die hämatologischen Untersuchungen sind in Tab. I und II angeführt. Tab. I enthält die Angaben der Patienten mit gesteigerter Hämolyse. Bei 11 von ihnen wurde eine mittelschwere bis leichte Anämie festgestellt. Die Reticulozytenwerte waren allgemein in einem Bereich von 23 bis 122% erhöht. Die Halbwertszeiten der mit Radiochrom markierten Erythrozyten bewegten sich um 11 bis 19

Tabelle I

Klinische und hämatologische Befunde bei Patienten mit gesteigerter Hämolyse (Gruppe I)

Nr.	Name, Alter, Geschlecht	Körperoberfläche, m ²	Erythrozyten, Mill.	Hb, g %	Reticulozyten, %	Direkter Ausdehnungsindex, Titer	Halbwertszeit der Erythrozyten (T _{1/2} in h)
1	K. A., 63, ♀	39	3,620	10,4	41	128	14
2	K. M., 64 ♀	30	3,280	9,8	48	64	15
3	M. K., 79 ♀	32	4,010	13,1	35	128	16
4	M. M., 51, ♀	13	—	10,1	57	32	—
5	M. S., 67 ♀	23	2,950	8,2	57	64	13
6	P. E., 33, ♀	19	2,990	8,5	67	2	—
7	P. F., 65, ♂	92	3,660	11,8	47	1024	—
8	R. L., 36, ♀	39	4,180	12,4	23	128	19
9	S. L., 56, ♀	50	3,280	10,7	62	256	16,5
10	S. F., 35, ♂	9	3,510	10,6	59	8	17
11	F. L., 16, ♀	1	4,050	12,4	69	32	—
12	L. H., 16, ♀	1	3,520	10,6	122	2	12
13	M. M., 68, ♀	26	2,930	9,8	49	1024	11
14	V. J., 16, ♀	1	3,850	10,9	111	16	13

Tage. (Bei 4 Patienten dieser Gruppe wurde eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer bereits früher festgestellt, die Ergebnisse sind in der Tabelle nicht angeführt.) Tab. II enthält die Angaben derjenigen Patienten, bei denen nach der Behandlung die Hämolyse zur Norm zurückkehrte. In der Gruppe a blieb der direkte Antiglobulintest positiv in der Gruppe b war er negativ. Die Werte des roten Blutbildes sind hier allgemein normal. In allen Untersuchungen der Erythrozytenlebensdauer wurden normale Halbwertszeiten festgestellt. Bei dem Patienten Nr. 14 dieser Gruppe konnte die Erythrozytenlebensdauer nicht ermittelt werden — er wurde auf Grund der wiederholt normalen Werte des roten Blutbildes und der Reti-

Tabelle II

Klinische und hämatologische Befunde bei Patienten mit normaler Hämolys. Gruppe IIa Patienten mit positivem direktem Antiglobulintest Gruppe IIb Patienten mit negativem Antiglobulintest und kompletter Remission.

IIa

Nr.	Name, Alter, Geschlecht	Krankheitsdauer Monate	Erythrozyten Mill.	Hb. %	Retikulozyten %	Direkter Antiglobulintest, Tit.	Halbwertszeit der Erythrozyten (T _{1/2} in T ₂)
13.	M. M., 70, ♀	51	4,410	13,5	13	0	24,5
14.	V. J., 16, ♀	4	4,450	13,3	11	128	—
15.	M. M., 75, ♀	79	4,580	14,3	14	32	28
16.	N. J., 39, ♂	84	5,380	16,2	13	64	26
17.	S. J., 57 ♀	40	4,980	13,4	7	128	24

Tabelle IIb

11.	F. J., 18, ♀	23	4,640	13,8	16	neg.	24
12.	L. H., 16, ♀	8	4,740	14,6	13	neg.	24
17.	S. J., 37 ♀	48	4,100	12,4	10	neg.	—
18.	P. M., 42, ♀	48	4,880	15,7	5	neg.	26
19.	R. R., 55, ♂	96	5,200	16,2	12	neg.	31
20.	V. M., 63, ♀	45	4,750	13,7	11	neg.	24

wiederholte Untersuchung bei Veränderung des Krankheitsstadiums.

ulozytenwerte in diese Gruppe eingereiht. Bei dem Patienten Nr. 17 ist das Ergebnis der Erythrozytenlebensdauer in der Gruppe IIa angeführt. Die Patienten, bei denen die Untersuchung bei dem Übergang aus einem Krankheitsstadium in das andere wiederholt wurde, wurden durch einen Stern bezeichnet (*).

Abb. 1 enthält die Ergebnisse der Untersuchungen der Erythrozytenglykolyse. Es geht daraus hervor, daß die glykolytische Aktivität in ihren Durchschnittswerten in allen Patientengruppen nicht von denjenigen normaler Personen abweicht. Bei der Gruppe mit Hämolys. (I) ist die Streuung größer.

Abb. 2 bringt die Ergebnisse der Respirationsuntersuchung der Erythrozyten in der Gegenwart von Methylblau. Bei den Patienten mit Hämolys. wurde eine signifikante Steigerung der Werte festgestellt. Beide Gruppen von Patienten mit einer normalen Erythrozytenlebensdauer zeigen keine Abweichungen von den Normalwerten.

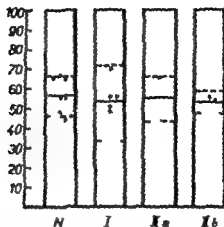


Abb. 1 Glykolyse der Erythrozyten, ausgedrückt in $\mu\text{l CO}_2/\text{l ml}$ Erythrozyten nach 3 Stunden Inkubation.

N: Normalwerte; I: Patienten mit gesteigerter Hämolyse; II: Patienten mit normaler Erythrozytenhaltbarkeit und positivem direktem Antiglobulintest; Ib: komplette Remission.

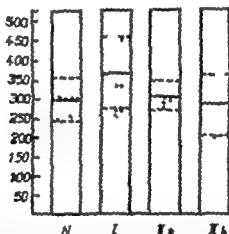


Abb. 2 Erythrozytenrespiration in Gegenwart von Methylenblau, ausgedrückt in $\mu\text{l/l ml}$ Erythrozyten nach dreistündiger Inkubation. Legende siehe Abb. 1

Tab. III zeigt das Niveau des reduzierten Glutathions vor und nach der Inkubation mit Acetylphenylhydrazin. Die Ergebnisse befinden sich im Bereich der Normalwerte.

Abb. 3 zeigt, daß die Aktivität der Glukoso-6-Phosphatdehydrogenase bei den Patienten der ersten Gruppe signifikant gesteigert ist, während bei denjenigen ohne Hyperhämolyse keine Abweichung von der Norm ermittelt wurde. Infolge der geringeren An-

Tabelle III

Stabilität des reduzierten Glutathions (in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Erythrozyten) nach Inkubation mit Acetylphenylhydrazin bei Patienten mit gesteigerter Hämolyse (I) mit normaler Erythrozytenlebensdauer und einem positiven direkten Antiglobulintest (IIa) und mit kompletter Remission (IIb)

Glutathion in μg je 100 ml Erythrozyten

Name	vor	nach	Name	vor	nach
	Inkubation			Inkubation	
K. A.	62	56	M. Ma.	68	58
K. M.	49	42	V J.	56	48
M. K.	69	61	D M.	56	53
M. M.	58	52	N J.	75	71
M. S.	58	52	S. J.	52	52
P E.	41	23		II	
P F.	78	66	S. J.		66
R. I.	70	68	P M.		66
S. L.	68	52	R. R.		30
S. F.	72	66	V M.		66
F J.	66	66	F J.		54
L. H.	72	66	L. H.		74
M. Ma.	■	62		IIb	
V J.	62	58			
I			Normalwerte	65 \pm 8	60 \pm 8

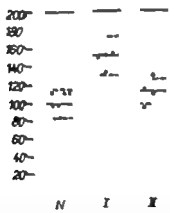


Abb. 3. Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase der Erythrozyten in internationalen Einheiten je 100 ml Erythrozyten.
N Normalwerte; I Patientes mit gesteigerter Hämolyse II Patientes mit normaler Erythrozytenlebensdauer

zahl der Untersuchungen hielten wir es nicht für angebracht, die zweite Patientengruppe in zwei Untergruppen einzuteilen, es war den jedoch keine Unterschiede zwischen Patienten mit positivem oder negativem direktem Antiglobulintest festgestellt.

Tabelle IV

Anorganischer Phosphor (AP) 2,3-Diphosphoglycerat (2,3 di PG) ATP und ADP in μM je 100 ml Erythrocyten vor und nach B- und 24stündiger Inkubation. In der Gruppe I befanden sich Patienten aus gestörter Hämolyse, in Gruppe II mit normalem Erythrocytenabauwert (Gr. N enthält Angaben über die normalen Durchschnittswerte und Grenzen).

Name	I					II				
	AP	2,3 di PG	AP	ADP	ATP	AP	2,3 di PG	ADP	ATP	
M. H.	0	0	24	0	24	0	24	0	24	24
P F	30	424	496	24	29	24	29	12,2	117	100
R. L.	37,5	300	46*	17	29	17	29	9,5	—	—
R. L.	57	416	478	23	81	23	81	11,7	114	82
S. L.	29	372	—	18	—	18	—	—	—	—
M. M.	37	560	432	17	72	17	72	11	119	72
S. F	31,5	392	403	22	43	22	43	16	114	91
Durchschnitt	33	387	446	20	51	20	51	10,8	116	87
Bereich	29-57,5	269-560	422-483	17-24	29-81	17-24	29-81	9,5-12,5	114-119	72-100

Name	I					II				
	AP	2,3 di PG	AP	ADP	ATP	AP	2,3 di PG	ADP	ATP	
P J	0	0	24	0	24	0	24	0	24	24
L. H.	28	424	—	16	—	16	—	—	—	—
S. L.	38	441	428	21	44	21	44	9,5	100	72
P. H.	34	382	383	18	23	18	23	10	102	81
V. H.	30,4	374	400	25	20	25	20	10,5	93	76
V. H.	36	384	467	28,6	78	28,6	78	12	108	88
Durchschnitt	33,2	404	493	21,7	43,5	21,7	43,5	10,4	101	80
Bereich	28-38	374-441	383-497	16-28,6	23-78	16-28,6	23-78	9,5-12	93-108	72-88

V

Name

AP

2,3 di PG

AP

ADP

ATP

Unterschied
Gr. N0
24
30
36
42
48
54
60
66
72
78
84
90
96
102
108
114
120
126
132
138
144
150
156
162
168
174
180
186
192
198
204
210
216
222
228
234
240
246
252
258
264
270
276
282
288
294
300
306
312
318
324
330
336
342
348
354
360
366
372
378
384
390
396
402
408
414
420
426
432
438
444
450
456
462
468
474
480
486
492
498
504
510
516
522
528
534
540
546
552
558
564
570
576
582
588
594
600
606
612
618
624
630
636
642
648
654
660
666
672
678
684
690
696
702
708
714
720
726
732
738
744
750
756
762
768
774
780
786
792
798
804
810
816
822
828
834
840
846
852
858
864
870
876
882
888
894
900
906
912
918
924
930
936
942
948
954
960
966
972
978
984
990
996
1002
1008
1014
1020
1026
1032
1038
1044
1050
1056
1062
1068
1074
1080
1086
1092
1098
1104
1110
1116
1122
1128
1134
1140
1146
1152
1158
1164
1170
1176
1182
1188
1194
1200
1206
1212
1218
1224
1230
1236
1242
1248
1254
1260
1266
1272
1278
1284
1290
1296
1302
1308
1314
1320
1326
1332
1338
1344
1350
1356
1362
1368
1374
1380
1386
1392
1398
1404
1410
1416
1422
1428
1434
1440
1446
1452
1458
1464
1470
1476
1482
1488
1494
1500
1506
1512
1518
1524
1530
1536
1542
1548
1554
1560
1566
1572
1578
1584
1590
1596
1602
1608
1614
1620
1626
1632
1638
1644
1650
1656
1662
1668
1674
1680
1686
1692
1698
1704
1710
1716
1722
1728
1734
1740
1746
1752
1758
1764
1770
1776
1782
1788
1794
1800
1806
1812
1818
1824
1830
1836
1842
1848
1854
1860
1866
1872
1878
1884
1890
1896
1902
1908
1914
1920
1926
1932
1938
1944
1950
1956
1962
1968
1974
1980
1986
1992
1998
2004
2010
2016
2022
2028
2034
2040
2046
2052
2058
2064
2070
2076
2082
2088
2094
2100
2106
2112
2118
2124
2130
2136
2142
2148
2154
2160
2166
2172
2178
2184
2190
2196
2202
2208
2214
2220
2226
2232
2238
2244
2250
2256
2262
2268
2274
2280
2286
2292
2298
2304
2310
2316
2322
2328
2334
2340
2346
2352
2358
2364
2370
2376
2382
2388
2394
2400
2406
2412
2418
2424
2430
2436
2442
2448
2454
2460
2466
2472
2478
2484
2490
2496
2502
2508
2514
2520
2526
2532
2538
2544
2550
2556
2562
2568
2574
2580
2586
2592
2598
2604
2610
2616
2622
2628
2634
2640
2646
2652
2658
2664
2670
2676
2682
2688
2694
2700
2706
2712
2718
2724
2730
2736
2742
2748
2754
2760
2766
2772
2778
2784
2790
2796
2802
2808
2814
2820
2826
2832
2838
2844
2850
2856
2862
2868
2874
2880
2886
2892
2898
2904
2910
2916
2922
2928
2934
2940
2946
2952
2958
2964
2970
2976
2982
2988
2994
3000
3006
3012
3018
3024
3030
3036
3042
3048
3054
3060
3066
3072
3078
3084
3090
3096
3102
3108
3114
3120
3126
3132
3138
3144
3150
3156
3162
3168
3174
3180
3186
3192
3198
3204
3210
3216
3222
3228
3234
3240
3246
3252
3258
3264
3270
3276
3282
3288
3294
3300
3306
3312
3318
3324
3330
3336
3342
3348
3354
3360
3366
3372
3378
3384
3390
3396
3402
3408
3414
3420
3426
3432
3438
3444
3450
3456
3462
3468
3474
3480
3486
3492
3498
3504
3510
3516
3522
3528
3534
3540
3546
3552
3558
3564
3570
3576
3582
3588
3594
3600
3606
3612
3618
3624
3630
3636
3642
3648
3654
3660
3666
3672
3678
3684
3690
3696
3702
3708
3714
3720
3726
3732
3738
3744
3750
3756
3762
3768
3774
3780
3786
3792
3798
3804
3810
3816
3822
3828
3834
3840
3846
3852
3858
3864
3870
3876
3882
3888
3894
3900
3906
3912
3918
3924
3930
3936
3942
3948
3954
3960
3966
3972
3978
3984
3990
3996
4002
4008
4014
4020
4026
4032
4038
4044
4050
4056
4062
4068
4074
4080
4086
4092
4098
4104
4110
4116
4122
4128
4134
4140
4146
4152
4158
4164
4170
4176
4182
4188
4194
4200
4206
4212
4218
4224
4230
4236
4242
4248
4254
4260
4266
4272
4278
4284
4290
4296
4302
4308
4314
4320
4326
4332
4338
4344
4350
4356
4362
4368
4374
4380
4386
4392
4398
4404
4410
4416
4422
4428
4434
4440
4446
4452
4458
4464
4470
4476
4482
4488
4494
4500
4506
4512
4518
4524
4530
4536
4542
4548
4554
4560
4566
4572
4578
4584
4590
4596
4602
4608
4614
4620
4626
4632
4638
4644
4650
4656
4662
4668
4674
4680
4686
4692
4698
4704
4710
4716
4722
4728
4734
4740
4746
4752
4758
4764
4770
4776
4782
4788
4794
4800
4806
4812
4818
4824
4830
4836
4842
4848
4854
4860
4866
4872
4878
4884
4890
4896
4902
4908
4914
4920
4926
4932
4938
4944
4950
4956
4962
4968
4974
4980
4986
4992
4998
5004
5010
5016
5022
5028
5034
5040
5046
5052
5058
5064
5070
5076
5082
5088
5094
5100
5106
5112
5118
5124
5130
5136
5142
5148
5154
5160
5166
5172
5178
5184
5190
5196
5202
5208
5214
5220
5226
5232
5238
5244
5250
5256
5262
5268
5274
5280
5286
5292
5298
5304
5310
5316
5322
5328
5334
5340
5346
5352
5358
5364
5370
5376
5382
5388
5394
5400
5406
5412
5418
5424
5430
5436
5442
5448
5454
5460
5466
5472
5478
5484
5490
5496
5502
5508
5514
5520
5526
5532
5538
5544
5550
5556
5562
5568
5574
5580
5586
5592
5598
5604
5610
5616
5622
5628
5634
5640
5646
5652
5658
5664
5670
5676
5682
5688
5694
5700
5706
5712
5718
5724
5730
5736
5742
5748
5754
5760
5766
5772
5778
5784
5790
5796
5802
5808
5814
5820
5826
5832
5838
5844
5850
5856
5862
5868
5874
5880
5886
5892
5898
5904
5910
5916
5922
5928
5934
5940
5946
5952
5958
5964
5970
5976
5982
5988
5994
6000
6006
6012
6018
6024
6030
6036
6042
6048
6054
6060
6066
6072
6078
6084
6090
6096
6102
6108
6114
6120
6126
6132
6138
6144
6150
6156
6162
6168
6174
6180
6186
6192
6198
6204
6210
6216
6222
6228
6234
6240
6246
6252
6258
6264
6270
6276
6282
6288
6294
6300
6306
6312
6318
6324
6330
6336
6342
6348
6354
6360
6366
6372
6378
6384
6390
6396
6402
6408
6414
6420
6426
6432
6438
6444
6450
6456
6462
6468
6474
6480
6486
6492
6498
6504
6510
6516
6522
6528
6534
6540
6546
6552
6558
6564
6570
6576
6582
6588
6594
6600
6606
6612
6618
6624
6630
6636
6642
6648
6654
6660
6666
6672
6678
6684
6690
6696
6702
6708
6714
6720
6726
6732
6738
6744
6750
6756
6762
6768
6774
6780
6786
6792
6798
6804
6810
6816
6822
6828
6834
6840
6846
6852
6858
6864
6870
6876
6882
6888
6894
6900
6906
6912
6918
6924
6930
6936
6942
6948
6954
6960
6966
6972
6978
6984
6990
6996
7002
7008
7014
7020
7026
7032
7038
7044
7050
7056
7062
7068
7074
7080
7086
7092
7098
7104
7110
7116
7122
7128
7134
7140
7146
7152
7158
7164
7170
7176
7182
7188
7194
7200
7206
7212
7218
7224
7230
7236
7242
7248
7254
7260
7266
7272
7278
7284
7290
7296
7302
7308
7314
7320
7326
7332
7338
7344
7350
7356
7362
7368
7374
7380
7386
7392
7398
7404
7410
7416
7422
7428
7434
7440
7446
7452
7458
7464
7470
7476
7482
7488
7494
7500
7506
7512
7518
7524
7530
7536
7542
7548
7554
7560
7566
7572
7578
7584
7590
7596
7602
7608
7614
7620
7626
7632
7638
7644
7650
7656
7662
7668
7674
7680
7686
7692
7698
7704
7710
7716
7722
7728
7734
7740
7746
7752
7758
7764
7770
7776
7782
7788
7794
7800
7806
7812
7818
7824
7830
7836
7842
7848
7854
7860
7866
7872
7878
7884
7890
7896
7902
7908
7914
7920
7926
7932
7938
7944
7950
7956
7962
7968
7974
7980
7986
7992
7998
8004
8010
8016
8022
8028
8034
8040
8046
8052
8058
8064
8070
8076
8082
8088
8094
8100
8106
8112
8118
8124
8130
8136
8142
8148
8154
8160
8166
8172
8178
8184
8190
8196
8202
8208
8214
8220
8226
8232
8238
8244
8250
8256
8262
8268
8274
8280
8286
8292
8298
8304
8310
8316
8322
8328
8334
8340
8346
8352
8358
8364
8370
8376
8382
8388
8394
8400
8406
8412
8418
8424
8430
8436
8442
8448
8454
8460
8466
8472
8478
8484
8490
8496
8502
8508
8514
8520
8526
8532
8538
8544
8550
8556
8562
8568
8574
8580
8586
8592
8598
8604
8610
8616
8622
8628
8634
8640
8646
8652
8658
8664
8670
8676
8682
8688
8694
8700
8706
8712
8718
8724
8730
8736
8742
8748
8754
8760
8766
8772
8778
8784
8790
8796
8802
8808
8814
8820
8826
8832
8838
8844
8850
8856
8862
8868
8874
8880
8886
8892
8898
8904
8910
8916
8922
8928
8934
8940
8946
8952
8958
8964
8970
8976
8982
8988
8994
9000
9006
9012
9018
9024
9030
9036
9042
9048
9054
9060
9066
9072
9078
9084
9090
9096
9102
9108
9114
9120
9126
9132
9138
9144
9150
9156
9162
9168
9174
9180
9186
9192
9198
9204
9210
9216
9222
9228
9234
9240
9246
9252
9258
9264
9270
9276
9282
9288
9294
9300
9306
9312
9318
9324
9330
9336
9342
9348
9354
9360
9366
9372
9378
9384
9390
9396
9402
9408
9414
9420
9426
9432
9438
9444
9450
9456
9462
9468
9474
9480
9486
9492
9498
9504
9510
9516
9522
9528
9534
9540
9546
9552
9558
9564
9570
9576
9582
9588
9594
9600
9606
9612
9618
9624
9630
9636
9642
9648
9654
9660
9666
9672
9678
9684
9690
9696
9702
9708
9714
9720
9726
9732
9738
9744
9750
9756
9762
9768
9774
9780
9786
9792
9798
9804
9810
9816
9822
9828
9834
9840
9846
9852
9858
9864
9870
9876
9882
9888
9894
9900
9906
9912
9918
9924
9930
9936
9942
9948
9954
9960
9966
9972
9978
9984
9990
9996
10002
10008
10014
10020
10026
10032
10038
10044
10050
10056
10062
10

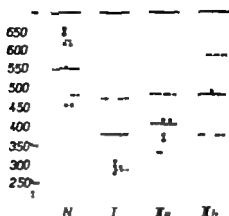


Abb. 4. Aktivität der Erythrocytenacetylcholinesterase, ausgedrückt in $\mu\text{l CO}_2/0,1 \text{ ml Erythrocyten/1 Std.}$ Legende siehe Abb. 1.

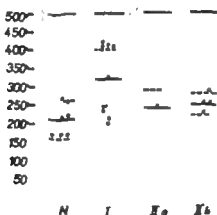


Abb. 5. Aktivität der sauren Phosphatase der Erythrocyten, ausgedrückt in Enzymeinheiten je 100 ml Erythrocyten. Legende siehe Abb. 1.

Weiter wurde der Spiegel des anorganischen Phosphates, des 2, 3-Diphosphoglycerats, ADP ATP sowohl in frischen Erythrocyten als auch nach 8 und 24stündiger Inkubation untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. IV angeführt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Normalwerten und denjenigen der Patienten bei der Gruppen gefunden.

Abb. 4 stellt die Acetylcholinesteraseaktivität dar. Die Werte waren bei den Patienten der ersten Gruppe und bei denjenigen ohne gestörte Hämolyse mit einem positiven direkten Antiglobulintest signifikant herabgesetzt gefunden während bei den Patienten mit

Tabelle I

Statistische Auswertung der biochemischen Ergebnisse
 Bezeichnung der einzelnen Gruppen siehe Abb. 1

		\bar{x}	I	IIa	IIb
Glykolyse	Σ	57	53	53	53
$\mu\text{l CO}_2/1 \text{ ml}$		± 10	± 19	± 11	± 5
Erythrozyten 3 Std.	t		0,75	0,3	1,2
	P		>0,5	>0,5	>0,2
Sauerstoffverbrauch	Σ	291	366	304	292
$\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml}$		± 54	± 97	± 37	± 73
Erythrozyten 3 Std.	t		2,45	0,45	0,5
	P		<0,05	>0,5	>0,5
Glukoso-6-phosphat- dehydrogenase	Σ	98	131	110	
I. E./100 ml		± 16	± 1	± 14	
Erythrozyten	t		6,09	1,23	
	P		<0,01	>0,1	
Acetylcholinesterase	Σ	555	331	412	425
$\mu\text{l CO}_2/0,1 \text{ ml}$		± 69	± 93	± 73	± 104
Erythrozyten/1 Std.	t		5,5	3,57	1,48
	P		<0,01	<0,01	>0,1
Saure Phosphatase	Σ	216	323	41	251
Einheiten/100 ml		± 50	± 78	± 43	± 30
Erythrozyten	t		4,27	0,9	1,29
	P		<0,01	>0,5	>0,1

 \bar{x} = Durchschnitt

= Standardabweichung

t = Wert des Student's t

P = Wahrscheinlichkeit

= Durchschnittswerte der Patientengruppe IIa und IIb.

kompletter Remission und negativem Antiglobulintest nicht von der Norm abweichen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der sauren Phosphatase der Erythrozyten sind in Abb. 5 dargestellt. Die Aktivität dieses Enzyms ist bei der ersten Patientengruppe signifikant gesteigert, während bei denjenigen ohne gesteigerte Hämolyse (beider Gruppen) keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden.

Diskussion

Wenn die Ergebnisse unserer Untersuchungen aller Patientengruppen mit Normalwerten (Tab. V) verglichen werden, kann festgestellt werden, daß bei den Patienten der ersten Gruppe mit gesteigerter Hämolyse und mit höheren Reticulozytenwerten die Aktivität der sauren Phosphatase, der Glukoso-6-Phosphat Dehy

drogenase und die Respiration der Erythrozyten in Gegenwart von Methylenblau gesteigert ist. Bei der zweiten Gruppe der Patienten waren bei positivem oder negativem direktem Antiglobulintest diese Enzymaktivitäten und die Respiration der Erythrozyten normal. Die Erklärung dieser gesteigerten Enzymaktivitäten in den Erythrozyten der ersten Gruppe der Patienten wird in der höheren Anzahl der Reticulozyten und jungen Erythrozyten dieser Kranken gefunden. Für saure Phosphatase der Erythrozyten stellten VALKENBURG *et al.* (23) eine Korrelation ihrer gesteigerten Aktivität mit der Reticulozytose fest. Eine Reihe von Verfassern (8 10 12 20) ermittelte eine höhere Aktivität der Glukoso-6-Phosphat Dehydrogenase bei der Reticulozytose. Die Dehydrogenase des Glukoso-6-Phosphats gemeinsam mit derjenigen des Glukono-6-Phosphats bilden die Hauptsymptome, welche den Sauerstoffverbrauch der reifen Erythrozyten im methylenblauhaltigen Milieu bestimmen (6). Der von uns festgestellte Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei der Inkubation der Erythrozyten mit Methylenblau bei den Patienten mit Reticulozytose bildet also eine der Folgen der gesteigerten Aktivität der Glukoso-6-Phosphatdehydrogenase in einer jüngeren Erythrozytenpopulation.

Es wurde bei unseren Patienten mit autoimmuner hämolytischer Krankheit keine Glykolysestörung festgestellt. Andererseits fand sich eine Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität bei den Patienten mit Hyperhämolysen sowie bei denjenigen mit einer normalen Halbwertszeit und einem positiven direkten Antiglobulintest, während die Werte bei den Patienten mit kompletter Remission normal waren. Die Herabsetzung der Aktivität war statistisch signifikant, obwohl geringer als bei den Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie, die früher untersucht wurden (5). Für diesen Befund besitzen wir vorläufig noch keine eindeutige Erklärung. Es ist möglich, daß es sich um die Inhibition des im Stroma lokalisierten Enzyms durch den an die Erythrozytenoberfläche gebundenen Antikörper handeln könnte. Diese Voraussetzung erfordert jedoch eine experimentelle Bestätigung, um so eher als SAKANE (19) bei einigen Patienten mit erworbener hämolytischer Anämie eine normale oder leicht gesteigerte Aktivität dieses Enzyms vorgefunden hat. Wir nehmen jedoch an, daß die herabgesetzte Aktivität der Acetylcholinesterase zur Hyperhämolysen in keiner Beziehung steht, wofür auch die normale Halbwertszeit der Erythrozyten von Patienten der zweiten Gruppe mit einem positiven direkten Anti-

globulintest spricht, die auch eine Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität aufweisen. Dies bezeugt auch die Studie von Metz *et al* (16) die festgestellt haben, daß die Blockierung dieses Enzyms bei normalen Erythrozyten mittels Octamethylpyrophosphorämid die Halbwertszeit der Erythrozyten bei deren Bestimmung mittels ^{51}Cr keineswegs beeinflusste.

Obwohl die festgestellte Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität nicht zur Aufklärung des Hämolysemechanismus bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit beigetragen hat, so sollte sie doch zur eingehenderen Untersuchung der Erythrozytenmembran, des Gehaltes und des Austausches der Phospholipide und zur detaillierten Untersuchung der Transportmechanismen der Erythrozyten bei dieser Krankheit führen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß an dem Untergang der sensibilisierten Erythrozyten zugleich mehrere Mechanismen teilnehmen, deren gegenseitiger Anteil an der Destruktion der Erythrozyten veränderlich ist und von einer Reihe bisher unbekannter Faktoren abhängt. Weitere Untersuchungen der biochemischen Veränderungen sensibilisierter Erythrozyten gemeinsam mit der Untersuchung der Erythrophagozytose und der Beziehung zwischen den sensibilisierten Erythrozyten und der Milz könnten vielleicht zu deren Auflösung beitragen.

Zusammenfassung

Bei Patienten mit autoimmuner hämolytischer Krankheit in verschiedenen Stadien wurden an den Erythrozyten die Glykolyse, die Respiration in Gegenwart von Methylblau, der Gehalt von ATP ADP 2, 3-Diphosphoglycerat und anorganischem Phosphor, die Stabilität des reduzierten Glutathions, die Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, der Acetylcholinesterase und der sauren Phosphatase untersucht. Bei Patienten mit Hyperhämolyse und erhöhten Reticulocytenwerten wurden signifikant geringere Aktivitäten der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, der sauren Phosphatase und der Respiration in Gegenwart von Methylblau festgestellt. Patienten mit einem positiven Antiglobulintest zeigten unabhängig von einer Hyperhämolyse eine beträchtliche Acetylcholinesteraseaktivität.

Summary

In patients with autoimmune hemolytic disease in various stages of development, glycolysis, cellular respiration in the presence of methylene blue, ATP ADP 2, 3-diphosphoglycerate and inorganic phosphate content, stability of reduced glutathione, and G-6-PDH, acetylcholinesterase and acid phosphatase activity were determined in the red blood cells. In those with hyperhemolysis and increased reticulocyte count, significantly lower levels of G-6-PDH and acid phosphatase activity and respiration in the presence of methylene blue were found. Patients with positive antiglobulin test showed reduced acetylcholinesterase activity regardless of whether or not they presented hyperhemolysis.

Résumé

Chez des malades ayant une hémolyse par auto-immunisation, nous avons déterminé dans les érythrocytes à différents stades de la maladie la glycolyse, le contenu en ATP et ADP le 2,3-diphosphoglycérate, le phosphore anorganique, la stabilité du glutathion réduit, l'activité de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase, l'acétylcholine-estérase et la phosphatase acide. Chez des malades ayant une hyperhémolyse et un nombre élevé de réticulocytes, nous avons trouvé des activités augmentées de façon significative de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase, de la phosphatase acide et de la respiration en présence de bleu de méthylène. Les malades ayant un test d'antiglobulines positif montrent indépendamment de leur hyperhémolyse, une activité réduite de l'estérase de l'acétylcholine.

Literatur

1. ASHOF, R. Die fermentative Spaltung des Acetylcholine. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **231**: 486 (1934)
2. BARTLETT G. R. Human red cell glycolytic intermediates. *J. biol. Chem.* **234**: 449 (1959)
3. BARTLETT G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. biol. Chem.* **234**: 466 (1959).
4. BEUTLER, R. The glutathione instability of drug-sensitive red cells. *J. Lab. clin. Med.* **49**: 311 (1957)
5. BRANKO, V. ČERNÝ, L. MICHÁŠKOVÁ, L. VOJTOVÁ, M. UND BÉKÁ, P. Unsere Untersuchungen über den Stoffwechsel und die Enzymaktivität der Erythrocyten bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie. *Folia haemat. (Leipzig)* **42**: 325 (1963).
6. BURE, M. AND YODKOWO, R. H. Stimulation of the glucose oxidative pathway in human erythrocytes by methylene blue. *J. biol. Chem.* **230**: 307 (1956)
7. DUBOVSKÝ, J. HODOVÁ, M. HALOŠEK, F. PALKA, J. UND ŠOKOL, J. Spektrophotometrische Methode zur Aktivitätsmessung des Pentosecyclus in Erythrocyten. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **24**: 1234 (1959).
8. FREEDMAN, M. M. KARR, B. S. AND LAPAN, R. Dehydrogenase of regenerating red blood cells in phenylhydrazine anemia. *Clin. chem.* **6**: 486 (1962)
9. GRUNERT R. R. AND PHILLIPS, P. H. A modification of the nitroprusside method of analysis for glutathione. *Arch. Biochem.* **30**: 217 (1951)
10. HENDRICKS, H. M. Die Erhöhung der Glukose-6-Phosphat-dehydrogenaseaktivität der Erythrocyten und ihre klinische Bedeutung. *Klin. Wochs.* **41**: 1014 (1963).
11. HOLLMANOWORTH, J. W. Erythrocyte glycolysis in hemolytic disease. *J. lab. clin. Med.* **45**: 920 (1955).
12. KAVRKO, C. UND RAPOPORT S. Atmung und Glukose-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität roter Blutkörperchen in verschiedenen Reifungs- und Absterbestadien. *Folia haemat. (Leipzig)* **38**: 140 (1962).
13. KOLBAK, J. in HOŠPÁL, J. UND SLAVÍK Základy chemického vyšetřování lékařství. Státní zdravot. naklad. Praha, 1957
14. KOURILSKO, A. HOLMES, R. L. AND COLOWICK, S. P.; KAPLA N. O. Method in enzymology. **3**: 232 (Academic Press, New York)
15. LÖW, G. W. UND WALLER, H. II. Hämolytische Erythrocytopathie durch Fehlen von Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase in roten Blutzellen als dominant vererbte Krankheit. *Klin. Wochs.* **35**: 865 (1958).
16. METZ, J.; STEVENS, K. von REISINGER, K. J. AND HART D. Failure of in vivo inhibition of acetylcholinesterase to affect erythrocyte life-span: the significance of the enzyme defect in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit. J. Haemat.* **7**: 458 (1961).

17. MISHKOVÁ, L. AND VOYKOVÁ, J.: Some biochemical changes in the stored ACD blood. *Vok. Sang.* 6: 179 (1961).
18. FRANKEL, T. A. J.: The red cell, p. 118 (Blackwell, Oxford 1961).
19. SANDER, J. C.: Erythrocytic cholinesterase levels in hematologic disease states. *Amer J Med.* 27: 81 (1959).
20. SALLER, S.; SANDMÖRER, F. AND BRAUNSTEINER, H.: Enzygehalt der Erythrocyten und effektive Erythropoese. *Wien. Z. inn. Med.* 44: 31 (1963).
21. STORTI, E., VACCARI, F. AND BALDINI, E.: Changes in red cells metabolism in presence of incomplete antibodies. *Experientia* 12: 108 (1956).
22. SZENDERO, A.; ANGER, Y. AND SERRA, C.M.: Studies on glutathione stability in erythrocytes of cases with past history of fivism or sulfa-drug-induced hemolysis. *Blood* 13: 348 (1958).
23. VALENTINE, W. N., TANAKA, K. R. AND FREDERICK, R. L.: Erythrocyte acid phosphatase in health and disease. *Amer J clin. Path.* 36: 329 (1961).
24. VOLEK, L., PALEK, J.; FRIEDMAN, R. AND BRABEC, V.: Aktivita glukozo-6-fosfat-dehydrogenazy u hemolytických stavů. *Čes. lék. čas.* (in Druck)

Adress des Autors: Dr. V. Brabec, U nemocnice I Praze 2 (Tschechoslowakei).

Desorption of Some Toxic Heavy Metals from Human Erythrocytes *in vitro*

By HANS PETER WITSCHI

Toxic heavy metals may be transported in the blood stream, at least partly by carrier substances such as blood cells, plasma proteins and/or other organic compounds. The centrifuging and primary subdivision of poisoned full blood shows that lead is attached to the erythrocytes approximately up to 96% (2). After CLARKSON et al. (3) inorganic mercury is attached to 50% to the erythrocytes, whereas SWENSSON et al. (17) point out that the cellular-bound fraction is only about 20%. Thallium is distributed equally between the plasma and the red cells (12, 18). Many interactions exist, however, between the surfaces of the erythrocytes and the surrounding plasma. More loosely bound components, mainly lipoproteins and lipids, can be removed easily from the membrane of the erythrocytes by repeated washings in saline (11) whereas a certain amount of plasma protein is adsorbed rather firmly (8). The film of plasma protein on the erythrocytic surface distinguishes itself essentially from the plasmatic proteins in its qualitative composition (6, 14).

The question now arises if there is a real binding of the mentioned heavy metals to ligands of the insufficiently defined cell membrane (16) or if the surface binding could be done, at least partly to a cellular adsorption of plasma components which might hold the metals. If the latter assumption is true, the removal of such components from the erythrocytic surface must lead to the desorption of heavy metals which are apparently fixed to the cells also.

This was investigated by experiments *in vitro* on human erythrocytes charged with heavy metals. According to the experi-

ments of JONES AND GARDNER (8) we suspended the erythrocytes, which had been incubated with metals and washed repeatedly beforehand, in their own plasma or in individual plasma fractions. With this procedure, a considerable amount of plasma components can be removed from the erythrocytic surface. The removal of lead, mercury and thallium into the surrounding medium was determined. Our results lead to the hypothesis that lead is bound chiefly to the deeper protein layers of the erythrocytic surface whereas mercury is rather fixed to lipoproteins, lipids and/or smaller thiols of the outer surface. Thallium apparently shows no definite predilection to binding-sites either in the plasma or in the cells.

Materials

Blood. Blood from healthy young donors (group O) was collected and used immediately or within 24 hours (storage: $+4^{\circ}\text{C}$). Anticoagulant: heparine (Liquemine® Roche). Plasma was obtained by centrifuging during 25 ml at 3000 g (temperature 0°C).

Radioactive metal-salts: Pb^{210} as lead acetate, specific activity 50 mCi/mM, 1 mCi dissolved in 0.5 ml of 8 N acetic acid. The product obtained was diluted with distilled water to an activity of 20 $\mu\text{Ci/ml}$. Hg^{203} as mercuric chloride, specific activity 1 Ci/g Hg, dissolved in 0.9% saline to 40 $\mu\text{Ci/ml}$. Tl^{205} as thallous sulfate, dissolved in 0.9% saline to 20 $\mu\text{Ci/ml}$.

Washing liquids: We used the following washing liquids

- Isotonic solution of potassium chloride (1.19%) pH 6.9
- Isotonic phosphate buffer pH 7.4 and pH 6.0, respectively
- Heparinized plasma compatible to the erythrocytes used.
- Plasma fractions: solutions containing 4 g% of proteins were prepared by dissolving the following materials in phosphate buffer (pH 7.4 or pH 6.0): lyophilized albumin, lyophilized gamma globulin and precipitate IV prepared according to KATLAS AND NORDMANN (10)
- Plasmacexpanders: Physogel® SRK 4.2% isotonic solution of gelatine molecular weight 30,000, pH 7.2; Macrodex® (Pharmacia, Uppsala), a high-molecular 6% solution of dextrane in saline, pH 7.3; Periston® (Bayer Leverkusen) 4% solution of high-molecular weight polyvinylpyrrolidone (PVP) isotonic with electrolytes, pH 7.4

Radioactive estimations: The γ -rays emitted by Pb^{210} and Hg^{203} were estimated in well-type NaI (TI) scintillation detector, 5 ml samples of liquid being measured. β -rays emitted by Tl^{205} were estimated under Geiger Müller end-window tube (II 50g/cm²) after drying 2 ml of liquid in metal-dishes under an infrared lamp. All estimations were made immediately after each experiment by counting at least 2000 counts with time-limit of 10–20 min. Philips-apparatus with one-channel discriminator scaler and highly stabilized high-voltage supply

Furnished by the Radiochemical Center, Amersham, England.

Furnished by the Eidg. Institut für Reaktorforschung, W. Graubünden, Switzerland.

Furnished by the Central Laboratory of the Swiss Red Cross, Blood Transfusion Service, Bern, Switzerland

Own determinations (glass electrode).

Methods

Preparation of metal-incubated red cells: Blood samples were mixed with 1–2 μ Ci radioactive metal-solutions per 1 ml of blood, allowed to stand for 60 min at room temperature, then the activity of 1 ml was measured. The blood was sharply centrifuged afterwards and samples of plasma and packed red cells taken for radioactivity estimations.

Removal of metal from red cells during repeated washings: 1 ml of packed erythrocytes was mixed with 10 ml of washing liquid and centrifuged during 4 min at 4000 rpm. Of the supernatant liquid an aliquot sample was taken for activity-determination and the remainder discarded. The cells were then resuspended in 10 ml of fresh washing liquid, allowed to stand for 15 min and centrifuged again. This procedure was repeated 12 times. After the 12th washing, the cell deposit was hemolyzed and the remaining activity in the sediment was estimated.

Calculations: The distribution of the metals between the erythrocytes and the plasma was calculated from the activity found in whole blood, in plasma and in the red cell deposit. The desorption of the metals from the incubated red cells into the washing liquids was calculated in the following manner: for each washing procedure, the number of counts per minute (cpm) removed was known measuring the activity in the respective washing liquids. The sum of the cpm removed in 12 washing procedures from the cells and the cpm remaining in the red cell deposit at the end of the experiment was taken as the initial activity (100%). Recoveries, as compared with the activity in 1 ml of packed cells before washing were good. From this initial activity a subtracted subsequently the cpm removed in each washing procedure. The calculated activity remaining in the red cell deposit after each washing was expressed as percentage of the initial activity. The results were plotted semilogarithmically as 'desorption curves' (remaining activity on ordinate against number of washing procedures on abscissa).

Results

1 Lead

Freshly drawn blood or blood stored for about 24 hours was incubated for 60 min with Pb^{210} acetate. Then the erythrocytes were separated from the plasma. 90–95% (average 92%) of the added Pb^{210} was found regularly in the red cell deposit.

Desorption of lead by washing erythrocytes in plasma. Lead-incubated red cells were washed 12 times with KCl-solution approximately 2–3% of the Pb^{210} content was removed with each washing. When we replaced the KCl-solution after the 6th washing with plasma, more Pb^{210} could be removed from the erythrocytes. The reverse procedure (washings No. 1–6 with plasma, No. 7–12 with KCl-solution) led to a pronounced removal of Pb^{210} from the cells during the first 6 washings, whereas afterwards only a negligible desorption-effect could be observed (fig. 1).

Effect of phosphate citrate and pH Pb^{210} laden red cells were washed 6 times with KCl-solution. Samples of them were then washed 6 times more in either phosphate-buffer pH 7.4 citrated

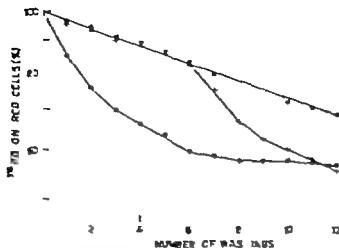


Fig 1 Removal of Pb^{2+} from incubated red cells by repeated washings. Sample A (O) was washed 12 times with KCl-solution. Sample B (+) was washed 6 times with KCl-solution and then 6 times more with plasma. Sample C (●) was washed first 6 times with plasma, followed by 6 washings with KCl-solution.

phosphate buffer or in plasma. The plasma removed 19.5% more Pb^{2+} from the cells than did the phosphate-buffer and 12.5% more than the citrated buffer. Analogue results were obtained in experiments in which we used a plasma containing the same phosphate concentration as the buffer.

Fig 2 represents the removal of Pb^{2+} from erythrocytes at various pH. 12 washings in phosphate-buffer pH 7.4 removed 23% of the initially present Pb^{2+} from the erythrocytes, whereas plasma (pH 7.7) removed 35%. The difference of 12% agrees with that of fig 1 where we compared the effect of plasma to the effect of KCl-solution (pH 6.9). Lowering the pH of buffer and plasma to pH 6.0 gave the following results: considerably more Pb^{2+} was desorbed under these conditions during the first washings (fig. 2). A partial flocculation of the erythrocytes was observed after the 5th washing in acidified plasma, but not in the acid buffer. It was observed, however, that plasma had removed 20% more Pb^{2+} after the 5th washing, before flocculation had occurred.

Washings with plasma fractions: In further experiments we used 4% solutions (pH 7.4) of albumin, gamma-globulin and precipitate IV, a heterogeneous mixture of alpha- and beta-globulins. Fig 3 shows that albumin removes only slightly more Pb^{2+} from the red

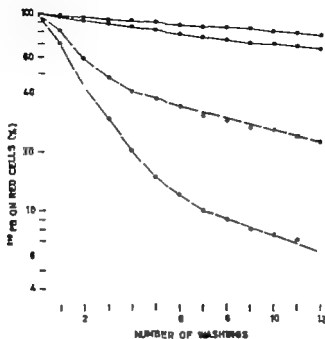


Fig. 2. Removal of Pb^{210} from incubated red cells by washings at pH 7.4 (uninterrupted lines) and pH 6.0 (dotted lines). Open circles 12 washings with phosphate-buffer; shadowed circles 12 washings with plasma.

Table I
Removal of Pb^{210} from red cells by washings with plasmaexpanders.

No. of washings	A	B	C	D
1	96.6	97.1	97.5	97.8
2	95.2	95.8	96.0	96.5
3	92.6	94.1	93.6	94.1
4	90.5	91.7	93.3	92.1
5	88.5	89.5	88.5	90.2
6	86.4	87.5	86.7	88.2
7	84.4	85.6	83.8	87.2
8	82.4	78.1	81.2	87.2
9	80.4	75.3	78.7	86.0
10	78.6	68.2	75.9	84.7
11	76.6	62.6	72.8	83.2
12	74.6	57.8	69.6	81.9

Four samples of incubated erythrocytes were washed 6 times with KCl-solution. Washings No. 7-12 were performed on sample A with KCl-solution (controls), on sample B with Physiogel® on sample C with Macroder® and on sample D with Periton®. Results are given as percentage of the initial activity (100%) remaining in the red cell deposit after each washing.

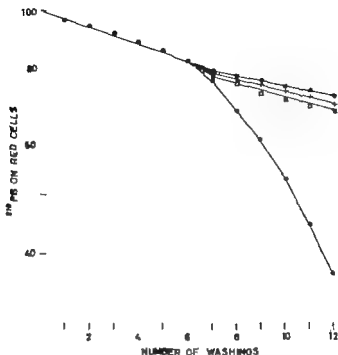


Fig. 3. Four samples of red cells incubated with Pb^{210} were washed 6 times with phosphate-buffer. After the 6th washing, sample A (O) was washed further with phosphate-buffer, sample B (□) with albumin, sample C (+) with gamma-globulin and sample D (●) with precipitate IV (4% solutions at pH 7.4).

cells than the phosphate buffer. Gamma-globulin had no effect at all, whereas precipitate IV removed 35% more Pb^{210} from the erythrocytes compared with the buffer.

Experiments with these solutions acidified to pH 6.0 followed identical desorption curves as represented in fig. 2. Flocculation of the red cells did not occur. Gamma-globulin removed 7.2%, albumin 11.5% and precipitate IV 12.7% more Pb^{210} from the red cells than the acid buffer solution alone.

Washings with plasmaexpanders. Pb^{210} incubated red cells were washed 6 times with KCl-solution. Sample A was then washed 6 times more with KCl, sample B with Phynogel ●, sample C with Macrodex ● and sample D with Periston ●. Results are given in table I. It was observed that after washings with Phynogel ● the activity of Pb^{210} in the red cell deposit decreased to a greater extent than with KCl or Macrodex ●, whereas Periston ● seemed rather to prevent the desorption of Pb^{210} from the cells.

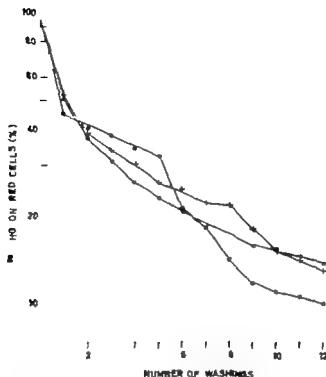


Fig. 4 Removal of Hg^{203} from incubated red cells by washing. Sample A (O) was washed 12 times with phosphate-buffer sample B (+) was washed 6 times with buffer and then 6 times more with plasma, sample C (●) was washed first 6 times with plasma, followed by 6 further washings with buffer

2. Mercury

The distribution of Hg^{203} between erythrocytes and plasma was dependent upon the blood used in freshly drawn blood, an average of 26% of the added metal attached to the cells, whereas in blood stored for about 24 hours, 45–55% of Hg^{203} was found in the red cell deposit. Erythrocytes washed 6 times with KCl-solution and incubated in Hg^{203} containing saline fixed up to 72% of Hg^{203} cells washed 12 times even more than 80 %. The more Hg^{203} initially taken up by the cells, the less could be removed in 12 washings in buffer solution or even in plasma.

Washings with plasma. Fig. 4 shows the results obtained one sample of Hg^{203} laden red cells was washed first 6 times with buffer pH 7.4 then another 6 times with its own plasma. A second sample

Table II
Removal of Hg^{200} from incubated red cells by washings with plasma.

No. of washings	A	B	C
1	64.9	66.3	72.7
2	49.2	51.6	60.1
3	39.8	42.6	65.4
4	33.1	36.2	54.8
5	28.5	32.2	50.7
6	25.9	29.5	45.5
7	24.1	26.1	57.9
8	22.8	25.0	29.0
9	22.0	24.7	26.0
10	21.5	24.1	25.5
11	20.6	23.8	24.3
12	20.2	23.5	23.4

Same type of experiment as represented in Fig. 4, whereby however red cells and plasma of another donor were used. Sample A: washings No. 1—12 with phosphate-buffer. Sample B: washings No. 1—6 with buffer, No. 7—12 with plasma. Sample C: washings No. 1—6 with plasma, No. 7—12 with buffer. The results indicate that sometimes even more Hg^{200} remained in the red cells by pre-washing them with their own plasma (sample C).

was washed 6 times with plasma followed by the same number of washings with buffer. Red cells washed 12 times in buffer served as control. In all samples there was a quick first removal of Hg^{200} from the erythrocytes, followed by a second rather slow decrease. The activity of Hg^{200} in the red cell deposit seemed to approach a final level asymptotically. The use of plasma instead of buffer had no influence upon the metal desorption. In some experiments we could even observe that by pre washing the cells with plasma more Hg^{200} was retained by the erythrocytes, whereas in subsequent washings with buffer solution the same final level was reached as in the control-experiment (table II).

Washings with plasma fractions and plasmacexpanders. After Hg^{200} -incubated red cells were suspended and centrifuged 6 times with buffer-solution, neither a 4% solution of albumin nor gamma-globulin was able to desorb more Hg^{200} from the erythrocytes than the inorganic medium alone. Suspending the cells first 6 times in these solutions produced no increased retention of Hg^{200} in the cell fraction. If we used a 4% solution of precipitate IV we made the following observations with stored red cells, the desorption-curves for 12 washings in buffer or 6 washings in buffer followed by 6 washings with precipitate IV were quite identical and similar to

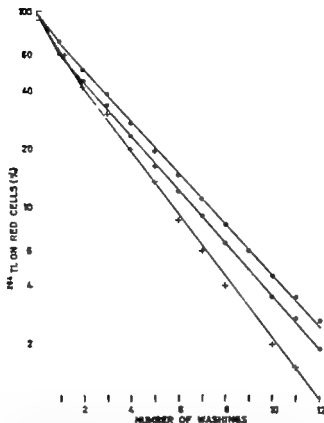


Fig. 5. Removal of TPase from incubated red cells by washing. Sample A (O) washings No. 1—12 with phosphate-buffer. Sample B (+) washings No. 1—6 with phosphate-buffer, No. 7—12 with plasma. Sample C (●) washings No. 1—6 with plasma, No. 7—12 with phosphate-buffer

those represented in fig. 4. If however the erythrocytes were first washed with precipitate IV desorption of Hg^{2+} was decreased, whereas in the 6 subsequent washings with buffer approximately the same final level was approached as for the controls. The same experiment performed with freshly drawn cells showed no retention of Hg^{2+} in the red cell deposit.

Liquids used for washing of pH 6.0 produced a sharp fall during the first three washings to a level of 10—20% of the initial activity. In the following steps almost no further Hg^{2+} could be removed. There were no differences between acid buffer and acidified plasma protein-solutions. Experiments with plasmaexpanders gave no significant results.

Table III
Removal of Tl^{204} from incubated red cells by washings.

No. of washings	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M
1	64.8	59.7	62.4	67.3	64.7	60.1	61.9	58.5	55.6	57.9	63.1	62.3
2	46.3	44.8	47.6	46.6	44.2	39.8	41.1	39.8	36.5	44.8	49.2	48.3
3	31.1	33.3	37.7	30.2	27.4	25.9	26.9	26.8	23.1	32.6	35.0	33.3
4	23.1	27.2	27.6	21.6	19.5	15.9	17.1	16.9	14.2	26.5	27.4	27.8
5	17.0	21.8	20.6	14.6	13.0	11.9	11.2	11.1	8.7	20.5	21.2	21.6
6	13.3	17.1	14.5	10.6	8.2	8.1	7.1	7.3	5.2	15.4	15.9	16.3
7	9.4	12.3	11.5	7.3	5.4	5.5	5.4	5.5	4.1	12.3	10.5	12.9
8	7.0	9.9	8.8	5.4	2.5	3.4	4.1	4.1	3.9	10.5	7.0	10.9
9	5.5	7.6	5.8	3.1	0.6	2.4	3.3	3.3	2.4	9.2	4.7	9.7
10	2.9	6.0	4.1	2.3	0.2	1.6	2.7	2.6	2.0	8.1	5.5	7.6
11	2.1	4.4	2.5	1.6	0.1	1.2	2.3	2.3	1.6	7.0	1.8	6.4
12	1.4	3.4	1.4	1.1	0.1	0.8	1.8	1.9	1.3	6.1	1.0	5.4

The data given in this table represent the percentage of initial activity of Tl^{204} remaining in the red cell deposit after each washing. The following washing liquids had been used: Sample A: washings No. 1—12 with phosphate-buffer pH 7.4. Sample B: washings No. 1—12 with KCl-solution, pH 6.9. Samples C, D and E: washings No. 1—6 with phosphate-buffer pH 7.4 followed by another 6 washings (No. 7—12) with albumin (sample C) gamma-globulin (sample D) or precipitate IV (sample E) 4% solutions, pH 7.4. Sample F: washings No. 1—12 with phosphate-buffer pH 6.0. Samples G, H and I: washings No. 1—6 with phosphate-buffer pH 6.0, followed by another 6 washings (No. 7—12) with 4% solutions at pH 6.0 of albumin (sample G) gamma-globulin (sample H) or precipitate IV (sample I). Samples K, L and M: 6 times with KCl-solutions washed red cells were washed for another 6 times (washings No. 7—12) with Physogel® (sample K) Macrodex® (sample L) or Periston® (sample M).

3 Thallium

In all our experiments, the distribution of Tl^{204} between red cells and plasma followed the same constant pattern and did not depend upon the ageing of the cells. Between 50—59% Tl^{204} was found in the erythrocytes (average value 56%).

Washing-experiments The results of all performed experiments were almost identical: in 12 washings, practically all the activity of Tl^{204} could be removed from the red cells into the liquids used for washing. On an average, 2% of the initially present activity remained in the red cell deposit at the end of the washing procedure. Fig. 5 shows a typical experiment. The desorption-curve represents a simple exponential function. Experiments performed with albumin, gamma-globulin or precipitate IV followed the same pattern, independent of pH. Experiments with plasmaexpanders gave analogous results (table III).

Discussion

Experiments on rats allowed us to formulate some provisional *working hypotheses on the protein transport of heavy metals* (19—21). It was therefore desirable to differentiate the problem in further studies. Experiments on human erythrocytes *in vitro* were judged promising to furnish more information for the following reasons: repeated washing of erythrocytes in saline removes some plasma proteins (13) and mainly lipids (11) from the surface of the red cells. But this desorption is a fairly complete one, and only by suspending erythrocytes in their own plasma can the more firmly bound surface molecules be exchanged against proteins and lipids of the liquid used for washing. These more firmly bound components represent lipids from 80 to 95 % and plasma proteins up to 25 % of all the electrophoretically separated fractions of serum proteins (8). The protein film covers about 10 % of the erythrocytic surface (14).

We were able to demonstrate that *lead* is removed from the erythrocytes to a greater extent by repeated washings in their own plasma than in pure inorganic medium. It was possible to eliminate the influence of phosphate- and citrate ions or the pH as a reason for the above result. In a heterogeneous mixture of alpha and beta globulins including lipoproteins (precipitate IV [10]) even more lead was desorbed from the cells than in plasma, albumin or gamma-globulin solutions. It may be concluded that a not inconsiderable amount of apparently cellular bound lead lies in the alpha and beta-globulin fractions of the protein film on the erythrocytic surface, this film (and therefore the lead, too) being exchangeable under appropriate conditions. We suppose therefore that lead is bound at least partly to the deeper layers of the plasma protein film on the erythrocytic surface. This view is confirmed by electron-microscopic studies (9) experiments dealing with the surface pH of lead intoxicated red cells (15) and investigations upon the qualitative composition of the red cell surface proteins (6). The question, however, remains open as to which proteins contained in our solutions of precipitate IV are chiefly involved in lead fixation: the metalbinding proteins such as transferrin and coereuloplasmin or may be lipoproteins could be taken into account.

However, complete desorption of lead from the cells was never obtained in our experiments. This could be explained as follows:

1. According to JONES AND GARDNER (8), even after 7 washings, 25–80% of the proteins bound to the erythrocytic surface remains deposited in the cells, whereas lipids are removed almost completely. Therefore complete desorption of all the lead-carrying molecules may not be expected.

2. Not all the lead on the erythrocytes is bound by proteins: some form, at least in part, colloidal phosphate ads on their surface, as proposed by CLARKSON AND KIRBY (4).

3. The possibility has to be considered that some lead penetrates into the cells during the experiment.

Among the plasmaexpanders tested Phynogel® removed lead to a great extent from the cells. The effect of Macrodex® was comparable to that of albumin (only slight removal) whereas Periston® seemed rather to prevent a desorption. It might be probable, therefore, that gelatine removes adsorbed plasma proteins from the red cells, whereas PVP exerts rather a binding effect. However the question remains unsettled in view the fact that little is known about the interactions of plasmaexpanders and erythrocytes. Perhaps the tentative treatment of lead poisoning with Phynogel® could give further information, at least from a practical standpoint.

The behaviour of *mercury* in our experiments was quite different from that of lead. During repeated washings of poisoned cells in inorganic medium, the concentration of mercury in the red cell deposit fell at first in fast steps, later rather slowly. The content of the red cells on mercury seemed to reach a final level asymptotically. Neither with plasma nor with its fractions could more mercury be removed from the cells. Sometimes, plasma or precipitate IV seemed even to bind the metal to the cellular surface.

After performing experiments with paper-electrophoresis, CLARKSON *et al.* had pointed out that mercury is bound to the albumin fraction (3). This protein is rather loosely adsorbed on the surface of the red cell (14). Our results could therefore agree with the hypothesis of an albumin-binding capability of mercury. Against this view are the following arguments: in paper-electrophoresis, the albumin peak does not represent at all a homogeneous fraction: immunochemical analysis detects other proteins in this band, too, especially some of the faster lipoproteins (5). Then there are other substances which are carried by albumin (1) and which might simulate a binding of mercury to this fraction. As LOVELL (11) was able to demonstrate, red cells are depleted by repeated washings in saline of superficial lipid components first rapidly later slowly. Thus, the possibility might be considered that mercury binds to the red cells by means of superficial, only loosely adsorbed

lipoproteins and/or serum lipids. Consistent with this view would be the chemical properties of mercury (7) and experimental results on rats (20). The observation of a binding effect of some plasmas or precipitate IV for mercury to the cell surface could then be explained by a re-uptake of such substances by the cells from the lipid-containing liquid used for washing.

Mercury shows marked affinity towards SH-groups which are widely distributed in the whole blood in form of smaller thiols, proteins and even haemoglobin (7). This fact has to be taken into account if one tries to estimate the binding sites of mercury to the various blood-components. In this connection, we made an observation in our experiments: unwashed red cells fixed less metal than pre-washed ones, which had been depleted from their surrounding film of plasma proteins and lipids, at least partly. The smaller this film seems to be, the greater is the amount of mercury fixed on the cells themselves, from where it can be removed by consequent washings in plasma or inorganic medium only with more difficulty and more incompletely. Ageing of cells seems to play not yet elucidated role, too, since older cells fix more mercury than freshly drawn ones.

Thallium was distributed about equally between the red cells and the plasma: our results agree with those of others (12, 18). All experiments gave identical results: in the course of 12 washings, the thallium content of the cell deposit decreased in the same manner independent of the liquids used for washing. The desorption-curves followed a simple exponential function graphically. An almost constant final level in the red cells was reached, about 2% of the initial thallium content. Therefore there exists a not yet clearly defined equilibrium between the thallium content of red cells and the surrounding medium. The observed removal of thallium from the cells might be considered as a phenomenon of pure diffusion: the underlying mechanism is not clear. Therefore we are not allowed to postulate a direct binding of this metal to serum components or red cells. This agrees with animal experiments on the intestinal excretion of thallium (21).

Our conclusions are based upon results obtained by indirect methods. They may therefore not possess the same value as chemical analyses of the binding of heavy metals to the components of the plasma. However it has been demonstrated that there may exist some interactions between red cells and the surrounding proteins and lipids containing medium. The problem of the transport function and transport-capacity of the plasma components for heavy metals requires further investigation.

Acknowledgements: I am particularly indebted to Prof. Dr. G. WAGNER and Dr. W. ROTTENFELS (Federal Office of Public Health, Dept. of Radiological Protection)

who generously allowed me to use their laboratories. My thanks are due to Prof. Dr. E. LAUFER and PD Dr. A. HÄMSÖ for their continued interest in this investigation. I am grateful to Dr. E. STAMFILL and Dr. P. KÄRLLA (Central Laboratory of the Swiss Red Cross, Blood Transfusion Service) for generously providing blood, plasma and protein fractions. Technical assistance was given by Miss U. BLASER. Dr. ALICE JÄGER and Mrs. T. V. HERR-JÄGER helped in preparing the manuscript.

Summary

Human red cells were incubated *in vitro* with Pb^{200} , Hg^{200} and Tl^{204} and thereafter washed repeatedly with different washing liquids. The desorption of these metals from the erythrocytes was determined. Under the conditions of our experiments we observed marked differences in the removal from apparently cellular bound metal into the surrounding medium between Pb^{200} , Hg^{200} and Tl^{204} . Preliminary conclusions are drawn about the possible binding sites of the examined metals on the red cell surface.

Résumé

Nous avons incubé des globules rouges humains avec du Pb^{200} , du Hg^{200} et du Tl^{204} . Les hématies ont été soumises ensuite à des lavages répétés dans des solutions différentes. Le Pb^{200} , le Hg^{200} et le Tl^{204} se détachaient d'une manière nettement différente de la surface des érythrocytes. Grâce aux résultats obtenus dans nos conditions expérimentales, nous avons tiré quelques conclusions préliminaires sur la nature éventuelle de l'attachement des métaux en rapport à la surface érythrocytaire.

Zusammenfassung

Menschliche Erythrozyten wurden *in vitro* mit Pb^{200} , Hg^{200} und Tl^{204} inkubiert und anschließend mit verschiedenen Waschflüssigkeiten wiederholt gewaschen. Die Desorption der Metalle von den Erythrozyten wurde verfolgt. Die unter unseren Versuchsbedingungen gewonnenen Desorptionskurven von Pb^{200} , Hg^{200} und Tl^{204} waren voneinander verschieden. Es werden einige vorläufige Schlussfolgerungen über die Bindung dieser Metalle an Bestandteile der Erythrozytenoberfläche gezogen.

References

1. BECKHOLD, H. Blutkreislauf und Transportvorgänge im menschlichen Körper. Klin. Wochr. 41: 109-119 (1963).
2. CASTELLINO, N. Acquisitions récentes en toxicologie industrielle au moyen de radio-isotopes. Contribution à l'étude du métabolisme du Pb^{200} . Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 20: 237-252 (1963).
3. CLARKE, T. W., G. TAYLOR, J. AND DALTON, CH. Studies on the equilibrium of mercury vapor with blood. Univ. of Rochester AEP Rep. No. 562 (1961).
4. CLARKE, T. W. AND KAPLAN, J. E. Uptake of lead by human erythrocytes *in vitro*. Biochem. J. 68: 432-439 (1958).
5. GRABAR, E. ET BURTON, P. Analyse immuno-électrophorétique. Applications aux Equilibres biologiques humains. 1ère éd. (Masson, Paris 1960).
6. GRAMLICH, F. UND MÜLLER, H. E. Weitere Untersuchungen zum Serumproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrozyten. Acta haemat., Basel 30: 236-243 (1963).
7. HUGGINS, W. L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. Ann. N. Y. Acad. Sci. 63: 454-460 (1957).

8. JONES, N. C. H. AND GARDNER, B. The exchange of ^{131}I -labelled lipid and ^{131}I -labelled protein between red cells and serum. *Biochem. J.* **83**, 404-413 (1962).
9. JUNG, F.: Zur Pathologie der roten Blutkörperchen. II. Mitteilung: Wirkungen einiger Metalle. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **204**, 139-156 (1947).
10. KETLER, P. AND NIRSCHMANN, H. Large scale production of human plasma fraction. *Vox Sang* **7**, 414-424 (1962).
11. LOVELOCK, J. E. The physical instability of human red blood cells. *Biochem. J.* **68**, 692-696 (1953).
12. LUND, A. Distribution of thallium in the organism and its elimination. *Acta pharmacol. toxicol.* **12**, 231-239 (1956).
13. MACFELL, A. Contribution à l'étude immunochimique des hémolysats de globules rouges humains. *Enzym. biol. clin.* **2**, 82-98 (1962/63).
14. MÜLLER, H. E. UND GRAMMICH, F. Die normale Zusammensetzung des Plasma-proteinfilms an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten. *Z. physiol. Chem.* **351**, 103-115 (1963).
15. PASSOW, H. UND WIESE, Ch. Das Grenzflächen-pH roter Blutkörperchen in Gegenwart von Schwermetallionen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 374-377 (1960).
16. FOWLER, E. The cell membrane and its properties; in BRADSHAW'S and MINSKY'S *The Cell*, vol. II, pp. 1-84 (Academic Press, New York/London 1961).
17. SWENSON, A.; LUNDQVIST, K. D. AND LUNDQVIST, O. Distribution and excretion of mercury compounds after single injection. *Arch. industr. Hyg.* **28**, 432-443 (1959).
18. THYSSON, N. Experimental investigation on thallium poisoning in the rat. *Acta dermat.-venereol.* **31**, 3-27 (1951).
19. WITKOW, H. P. Tierexperimentelle Untersuchungen zur enteralen Exkretion. *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* **28**, 449-460 (1964).
20. WITKOW, H. P. Untersuchungen über die intestinale Ausscheidung von Quecksilber bei Ratten. *Beitr. gerichtl. Med.* **23**, 288-296 (1963).
21. WITKOW, H. P. AND LUDWIG, E. Intestinal protein-loss and excretion of some toxic heavy metals. 3rd Symp. on Physiology and Pathophysiology of Plasma Protein Metabolism, Grindelwald 1964 (Huber Bern 1965).

Author's address: Dr H. P. Witkow, Toxicology Research Unit, Medical Research Council Laboratories, Watlington Road, Oxford/Oxford (England).

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Innsbruck (Vorstand: Prof. Dr. H. BRÄUNINGER) und dem Department of Haematology (Vorstand: Prof. Dr. J. V. DACE) und Radiotherapy der Postgraduate Medical School, London

Die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrozytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien

Von H. HUBER* S. M. LEWIS UND L. SZUR

Wegen ihrer Einfachheit und guten Reproduzierbarkeit gehört die Bestimmung von Blutvolumen (BV) und zirkulierender Erythrozytenmenge (EM) zu den Standardmethoden klinischer Isotopenlaboratorien. Allerdings sind diese Bestimmungen nur dann indiziert, wenn konventionelle Methoden nicht befriedigen oder die Untersuchten und Untersucher mehr belasten. Bei Polycythaemia vera (1-7) und sekundären Polyglobulien (8-12) wurden BV und EM von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt; ein systematischer Vergleich mit den Ergebnissen konventioneller hämatologischer Untersuchungen fehlt unseres Wissens jedoch insbesondere bei größeren Polycythaemiegruppen. Ziel der vorliegenden Mitteilung ist es, die Beziehung zwischen BV, EM und peripherem Hämatokrit zu definieren und zur Frage Stellung zu nehmen, ob diese Isotopenuntersuchungen den üblichen Methoden in der Abgrenzung des Schweregrades einer Polycythaemia – behandelt oder unbehandelt – bzw. einer Polyglobulie überlegen sind. Schließlich sollte untersucht werden, ob die Bestimmung von BV und EM in der Differentialdiagnose Polycythaemia vera und sekundäre Polyglobulie verwendet werden kann.

Material und Methode

Polycythaemia vera. Die Gruppe umfaßt 73 Patienten mit Polycythaemia vera. Die Diagnose wurde aus dem peripheren Blutbild, einer Knochenmarkspunktion bzw. Knochenbiopsie, dem Ausschluss einer zur Polyglobulie führenden polyzonalen und der

Die Untersuchung wurde teilweise durch ein Fellowship der Internationalen Atomik Energy Agency Wien, ermöglicht.

dalen Erkrankung sowie in manchen Fällen durch die Bestimmung der Sauerstoffättigung des peripheren Blutes gestellt. Patienten mit stärkerer Milzvergrößerung (unterer Rippenbogen mehr als 10 cm unter dem Rippenbogen), wurden von dieser Gruppe ausgeschlossen, einerseits weil es sich in diesen Fällen, wie Knochenbiopsien zeigten, meist um Übergangsstadien zur Myelofibrose handelt, andererseits weil Splenomegalien – wie an anderer Stelle angeführt (14) – charakteristischen Blutveränderungen führen und so die Homogenität der Gruppe stören könnte.

Polyglobulie aus der Hämoglobinurie nach ^{51}Cr -Behandlung Die Gruppe umfaßt 16 Patienten mit sekundärer Polyglobulie als Folge chronischer pulmonaler Erkrankungen, gewöhnlich ohne gleichzeitige cardiale Dekompensation.

Vergleichsgruppe Um die Beziehung zwischen Hämatokrit, Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM) und Blutvolumen (BV) über einen weiten Bereich vergleichen zu können, wurden den Patienten mit Polycythämie bzw. Polyglobulie eine Vergleichsgruppe anämischer und hämatologisch normaler Personen gegenüber gestellt. Es handelt sich um 85 Patienten (48 Männer 37 Frauen) mit Anämien verschiedener Ursache und Schwere: die keine stärkere Milzvergrößerung zeigten, und 40 Personen ohne hämatologische Erkrankungen (21 Männer 19 Frauen). Patienten mit chronischen Leber- und Nierenerkrankungen, solche unter hochdosierter Steroidtherapie, Schwangere und Patienten mit primär-chronischer Polyarthritis wurden von der Vergleichsgruppe ausgeschlossen. Es handelte sich um Patienten mit kongenitaler hämolytischer Anämie (14), erworbenem hämolytischer Anämie (71) aplastischer Anämie (21) Eisenmangelanämie (19) Leukämien (5) und symptomatischen Anämien anderer Ursache (5). Bei den 40 Personen ohne Anämie (Hämatokrit 40 bis 54%) im weiteren als „Kontrollgruppe“ bezeichnet, um 7 gesunde Freiwillige und um Patienten mit verschiedenen internen und chirurgischen Erkrankungen inkl. 14 Patienten mit lokalisierten Tumoren, jedoch ohne Hinweis auf hämatologische Erkrankungen. Über diese Vergleichsgruppe wurde an anderer Stelle ausführlich berichtet (14).

Bestimmung der Gesamtmenge der Erythrozyten (EM) Das patienteneigene Erythrozyten wurden mit etwa 30–100 μCi ^{51}Cr hoher spezifischer Aktivität (Radiochemical Centre Amsterdam) als Na_2CrO_4 nach der in unseren Laboratorien üblichen Standardmethode markiert (15). 15–20 Minuten nach der Injektion der chrommarkierten Erythrozyten wurden zumindest ein, meist zwei Blutproben entnommen. Jeweils 3 ml der Blutprobe und des Standards wurden in einem Bohrkristall gezüchtet und zumindest 10^4 Impulse pro Probe gezählt, der Zähler lag also innerhalb $\pm 2\%$. Die Normalwerte der EM, bezogen auf das Körpergewicht, betragen in der Kontrollgruppe (40 Personen) 27,16 ml/kg mit einer Standardabweichung von $\pm 4,11$ ml/kg.

Bestimmung des Blutvolumens (BV) Das BV wurde aus der EM und dem Körperhämatokrit errechnet. Der Körperhämatokrit ist nach CHAPLIN et al. (16) durch den peripheren Hämatokrit mal einem Korrekturfaktor gegeben (0,91) der über einen weiten Hämatokritbereich konstant ist. Die Normalwerte des BV betragen in der Kontrollgruppe (40 Personen) 67,65 ml/kg mit einer Standardabweichung von $\pm 7,16$ ml/kg.

Hämatokritbestimmung Eine Mikrohämatokritmethode wurde verwendet, wobei 5 Massen bei ca. 12.000 g zentrifugiert wurde. Auf das Korrektur für „strapped plasma“ da vernachlässigbar gering (17) wurde bei dieser Methode verzichtet.

Ergebnisse

Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM)

Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Die EM betrug bei den Polycythämikern 55,3 ($\pm 9,2$) ml/kg bei den Polyglobuliepatienten 46,9 ($\pm 12,8$) ml/kg. Er

wartungsgemäß war die EM der Polycythämiker im Mittel signifikant höher als der Polyglobuliepatienten ($p < 0,01$)

Hämatokrit

Der Hämatokrit der Polycythämiker betrug im Durchschnitt 60,9% ($\pm 6,4\%$) der Polyglobuliepatienten 59,1% ($\pm 8,3\%$).

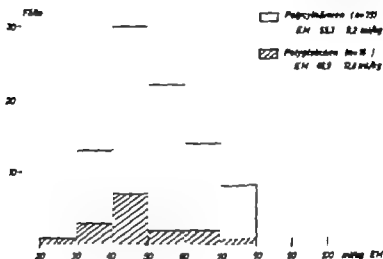


Abb. 1. Überlebens Erythrozytenmenge (EM) der Patientengruppen.

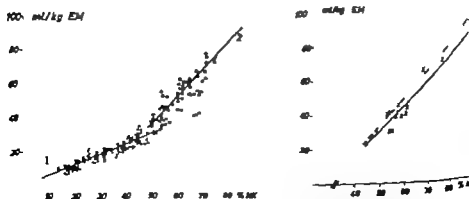


Abb. 2. Vergleich von Hämatokrit (HK) und Erythrozytenmenge (EM).

- 1 Vergleichsgruppe (●) $EM = 0,596 HK + 0,71$
- 2 Polycythämie (○) $EM = 1,568 HK - 42,46$
- 3 Polyglobulie (◐) $EM = 1,420 HK - 58,02$

Vergleich von Erythrozytenmenge und Hämatokrit

1) *Polycythæmia vera*. Während in der Vergleichsgruppe (Hämatokrit 12–34%) eine ziemlich enge Beziehung zwischen EM und Hämatokrit bestand und Änderungen der EM durch den Hämatokrit hinreichend gut wiedergegeben wurden (Abb. 2) war der Hämatokrit bei Polycythämikern ein weniger empfindlicher Index der EM. Einerseits streuten die Ergebnisse der beiden Bestimmungsmethoden stärker als in der Vergleichsgruppe ($p < 0.05$). Andererseits wurden Veränderungen der EM durch den Hämatokrit in der Polycythämikergruppe weniger empfindlich wiedergegeben als in der Vergleichsgruppe. Im Hämatokritbereich unter 50% führte eine Zunahme der EM von 60 ml/kg zu einem mittleren Hämatokritanstieg von 10%, bei den Polycythämikern war jedoch eine Erhöhung der EM von 15.7 ml/kg zum gleichen Hämatokritanstieg notwendig. Die Regressionskoeffizienten der beiden Gruppen unterscheiden sich daher auch hochsignifikant ($p < 0.001$). Polycythämiker $b = 1,57 \pm 0,16$ Vergleichsgruppe $0,66 \pm 0,03$).

2) *Behandelte Polycythæmia*. Bei allen 20 Patienten war der Hämatokrit nach ^{32}P Therapie auf Normalwerte abgefallen. Auch die EM lag nach der Behandlung bei 17 Patienten im Normalbereich. In den 3 Fällen mit weiterhin leicht erhöhter EM war das BV nicht auf Normalwerte abgefallen, wodurch die Diskrepanz zwischen erhöhter EM trotz normalem Hämatokrit zustandekam (Abb. 3).

3) *Sekundäre Polyglobulie*. In der Patientengruppe mit sekundärer Polyglobulie entsprach einer Zunahme des Hämatokrites um 10% eine durchschnittliche Erhöhung der EM um 14,2 ml/kg. Wie der Vergleich der Regressionsgeraden der Polycythämiker mit der der Polyglobuliepatienten zeigte (Abb. 2) war bei gegebenen Hämatokrit die EM der Polycythämiker durchschnittlich etwas höher als die der Polyglobuliepatienten. Im Einzelfall überschritten sich allerdings die Ergebnisse der beiden Gruppen zu sehr, als daß diese Bestimmung für die Differentialdiagnose Polycythæmie oder Polyglobulie geeignet wäre.

Blutstromen (BV)

58 der 73 Polycythämiker und 9 der 16 Polyglobuliepatienten zeigten ein über den Normbereich erhöhtes BV (Abb. 4). Im Mittel betrug es in der ersten Gruppe $94.7 (\pm 17.7)$ ml/kg, in der zweiten $83.8 (\pm 15.1)$ ml/kg. Die Erhöhung des BV war der Zunahme der

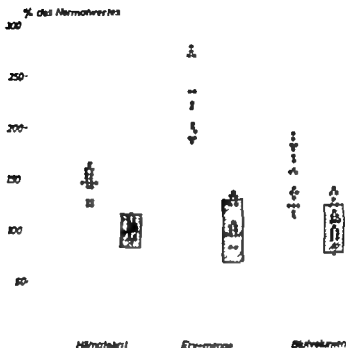


Abb. 3. Hämatokrit, Erythrozytenmenge und Blutvolumen bei Polycythaemiepatienten vor (○) und nach (●) ^{32}P Behandlung. Normalbereich schraffiert.

EM korreliert ($b = 0.90$ bzw. 0.97) einer Zunahme der EM um 10 ml/kg entsprach eine mittlere BV Zunahme von 11.3 ml/kg bei den Polycythämikern und von 11.0 ml/kg bei den Polyglobuliepatienten (Abb. 5). Über das Ergebnis der BV Bestimmungen bei behandelten Polycythämikern siehe Abb. 3.

Diskussion

Da die konventionellen hämatologischen Untersuchungsmethoden zur Diagnose einer Polycythämie bzw. Polyglobulie hinreichen ist eine Bestimmung von Blutvolumen (BV) und Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM) klinisch wohl nur dann indiziert, wenn sich daraus bessere quantitative Aussagen über den Schweregrad einer Plethora machen lassen. Diskrepanzen zwischen klinischem Erscheinungsbild und Hämatokritanstieg bei Polycythaemia vera wurden in mehreren Arbeiten beschrieben (1, 4, 5, 6, 18). Sie ergeben sich auch aus einem Vergleich von EM und Hämatokrit. Bei 73 in diesem Rahmen untersuchten Polycythäm-

30 Zahl der Patienten

□ POLYCYTHÄMIEN (n=23)
BV $9(7-17)$ ml/kg

▨ POLYGLOBULINEM (n=16)
BV $8(3-15)$ ml/kg

20

10



Abb. 4 Blutvolumen (BV) der Patientengruppen.

kern war die EM im Mittel auf das Doppelte, im Einzelfall bis auf das über Dreifache des Normwertes erhöht. Dagegen hatte der Hämatokrit im Mittel nur um die Hälfte zugenommen. Ein ähnliches Verhalten wurde bei 16 Polyglobulinpatienten beobachtet. Die geringere Empfindlichkeit des Hämatokrites findet wohl ihre Erklärung im Verhalten des BV bei dieser Erkrankung.

In einer eigenen (14) sowie in anderen (8, 19) Arbeiten wurde ein – abgesehen von individuellen Variationen – konstantes BV über einem Hämatokritbereich von 20–50 / gefunden. Voraussetzung ist allerdings, daß man – wie in unserer Vergleichsgruppe – mögliche Verdünnungsanämien ausschließt, also Patienten mit ausgeprägter Splenomegalie (14, 20, 21, 22), chronischen Leber- (23) und Nierenerkrankungen (24, 25), Schwangere (26), Patienten mit primär-chronischer Polyarthrit (27) und solche unter hohen Steroiddosen (28). Zwischen Hämatokrit und EM besteht dann, wie gezeigt werden konnte, eine ziemlich enge Beziehung (8, 14, 19). Dagegen veränderten sich in unserer Polycythämikergruppe EM und BV gleichsinnig (Abb. 4). Eine Zunahme der EM um 10 ml/kg war von einer durchschnittlichen Erhöhung des BV um 11,3 ml/kg begleitet. Es ist einleuchtend, daß diese gleichsinnige Zunahme zu einem Empfindlichkeitsverlust der konventionellen hämatologi-

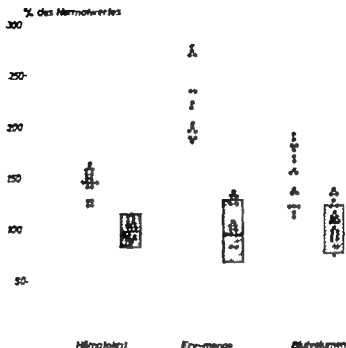


Abb. 3. Hämatokrit, Erythrozytenmenge und Blutvolumen bei Polycythaemicapatienten vor () und nach (●) 50P-Behandlung. Normalbereich schraffiert.

EM korreliert ($b = 0,90$ bzw. $0,97$) einer Zunahme der EM um 10 ml/kg entsprach eine mittlere BV Zunahme von $11,3 \text{ ml/kg}$ bei den Polycythämikern und von $11,0 \text{ ml/kg}$ bei den Polyglobuliepatienten (Abb 5). Über das Ergebnis der BV Bestimmungen bei behandelten Polycythämikern siehe Abb 3.

Diskussion

Da die konventionellen hämatologischen Untersuchungsmethoden zur Diagnose einer Polycythämie bzw. Polyglobulie hinreichen, ist eine Bestimmung von Blutvolumen (BV) und Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM) klinisch wohl nur dann indiziert, wenn sich daraus bessere quantitative Aussagen über den Schweregrad einer Plethora machen lassen. Diskrepanzen zwischen klinischem Erscheinungsbild und Hämatokritanstieg bei Polycythaemia vera wurden in mehreren Arbeiten beschrieben (1-4, 5, 6-18). Sie ergeben sich auch aus einem Vergleich von EM und Hämatokrit. Bei 73 in diesem Rahmen untersuchten Polycythäm-

der brückeren Aderlassbehandlung auch bei weitgehenden Hämatokritabfall ausbleiben*. Einer Normalisierung des Hämatokrites entsprach auch in 17 der 20 Fälle eine Verminderung der EM auf Normalwerte, in den übrigen Fällen lag die EM gerade über dem Normbereich. Wir glauben daraus schließen zu können, daß die Bestimmung der EM bei Polycythämikern am Höhepunkt der Erkrankung angezeigt ist, die konventionellen Methoden zur Kontrolle des Therapieerfolges jedoch im Allgemeinen genügen.

Über die Veränderungen der EM im Vergleich zum Hämatokrit bei Polyglobuliepatienten liegen widersprechende Berichte vor. MOLLISON et al. (8) fanden bei Säuglingen mit einem Hämatokrit bis über 70% einen zunehmenden Empfindlichkeitsverlust des Hämatokrites, der unseren Ergebnissen vergleichbar ist. Dagegen beschrieb VEREL (10) bei sekundären Polyglobulien als Folge kongenitaler Vitien im Verhalten von BV und EM Unterschiede gegenüber Polycythämiepatienten. Trotz erheblicher Zunahme der EM fehlten stärkere BV Zunahmen bei den von ihnen untersuchten Polyglobuliepatienten, fanden sich jedoch, hier in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, bei den Polycythämikern. Wir beobachteten dagegen eine gleichninnige Zunahme von BV und EM auch bei unserer Gruppe pulmonal bedingter Polyglobulie. Bei gegebenem Hämatokrit war die EM der Polycythämiker im Durchschnitt vielleicht etwas höher als die der Polyglobuliepatienten, jedoch nicht genug um aus diesen Bestimmungen im Einzelfall die Differentialdiagnose Polycythæmia vera oder sekundäre Polyglobulie zu erlauben. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit BEALIN et al. (1). Die Patientengruppe mit sekundärer Polyglobulie war mit 16 Fällen allerdings ziemlich klein, und weitere Untersuchungen an einem größeren Material könnten von Interesse sein.

Es ginge über den Rahmen dieser Untersuchungen hinaus, Erklärungen für das unterschiedliche Verhalten des BV bei einem Hämatokrit von über und unter 50% zu finden. Während das Plasmavolumen bei Anämien Veränderungen der EM hinreichend kompensiert und dadurch im Allgemeinen ein konstantes BV aufrecht erhält (8, 14-19) fällt es bei erhöhter EM kaum unter den Normalwert ab woraus die gleichninnige Zunahme von BV und EM resultiert. Die klinische Konsequenz dieses Verhaltens ist allerdings, daß eine extreme Viskositätszunahme des Blutes verhindert

wird, im Plasma zirkulierende Substanzen in ihrer Gesamtmenge nicht stärker abnehmen und letztlich die Notwendigkeit, exaktere Vorstellungen über das Ausmaß einer Erythrozytenvermehrung nicht durch Konzentrationsmessungen, sondern durch Isotopenmethoden, die auf dem Verdünnungsprinzip beruhen, zu erhalten.

Zusammenfassung

Nach Markierung der Patientenerythrozyten mit ^{51}Cr wurde zirkulierende Erythrozytenmenge (EM) und Blutvolumen (BV) bei 73 Patienten mit Polycythaemia vera (in 20 Fällen auch nach erfolgreicher ^{32}P Therapie) und bei 16 Patienten mit sekundärer Polyglobulie bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit der Hämatokritbestimmung verglichen, woraus sich folgende Schlussfolgerungen ergeben: 1. Die Hämatokritbestimmung ist bei Polycythaemia vera und sekundärer Polyglobulie ein wenig empfindlicher Index des Schweregrades dieser Erkrankungen. 2. Die geringe Empfindlichkeit dieser auf Konzentrationsänderungen beruhenden Methode ist durch die gleichzeitige Zunahme von EM und BV bedingt. Bei einem Hämatokrit unter 50% ergeben beide Methoden unter bestimmten Voraussetzungen gut vergleichbare Resultate; 3. Die Isotopenmethode ist zur Feststellung des Schweregrades einer Plethora indiziert. Eine Differenzialdiagnose Polycythaemia vera oder sekundäre Polyglobulie ist damit nicht möglich. Zur Kontrolle des Therapieerfolges mit ^{32}P genügen konventionelle hämatologische Methoden.

Summary

The number of circulating erythrocytes and the blood volume were determined in 73 patients with polycythaemia vera (including 20 cases successfully treated with ^{32}P) and 16 patients with secondary polycythaemia, after the patients' red cells had been labelled with ^{51}Cr . The results were compared with haematocrit determinations, and the following conclusions drawn: 1. haematocrit is a less sensitive indication of the degree of severity of polycythaemia vera and secondary polycythaemia. 2. the relative insensitivity of these methods depending on changes in concentration is due to the parallel increase in blood volume and red cell count. With haematocrit levels below 50%, both methods give comparable results under certain circumstances. 3. the isotope method is indicated for determining the severity of polycythaemia. Differentiation between polycythaemia vera and secondary polycythaemia is not possible by this means. Conventional haematological methods are sufficient to confirm the results of radiophosphorus therapy.

Résumé

Chez 73 malades atteints de la maladie d'Ossler Vaquez (dans 20 cas également après une thérapie efficace au ^{32}P) et chez 16 malades ayant une polyglobulie secondaire, la masse des érythrocytes en circulation et le volume sanguin ont été déterminés à l'aide du marquage des érythrocytes au ^{51}Cr . Les résultats ont été comparés aux déterminations de l'hématocrite. Les conclusions suivantes peuvent être tirées: 1. Pour la maladie d'Ossler Vaquez et la polyglobulie secondaire l'hématocrite est un index peu sensible de la gravité de ces maladies. 2. La faible sensibilité de cette méthode résultant des changements de concentration est déterminée par l'augmentation concomitante de la masse d'érythrocytes et du volume sanguin. A un hématocrite de 50%, les deux méthodes livrent dans certaines conditions des résultats comparables. 3. La méthode des

isotopes est indiquée pour la détermination du degré de pléthore. Elle ne permet pas la différentiation entre la maladie d'Oiler Vaquez et une polyglobulie secondaire. Pour les contrôles des résultats de la thérapie au ^{32}P les méthodes hématologiques conventionnelles suffisent.

Literatur

1. BELLIN, K. L.; LAWRENCE, J. H. AND GARTLAND, J. Blood volume in polycythemia as determined by ^{51}Cr labelled red blood cells. *Amer. J. Med.* 9: 747 (1950)
2. STROHMEIER, C. F., HALL, B. E. AND PRAKE, G. L. Evaluation of radiophosphorus therapy in primary polycythemia. *J. Amer. med. Ass.* 146: 1901 (1951)
3. WASTENHO, H. The total amount of haemoglobin and the blood volume in polycythemia vera treated with radiophosphorus. *Acta med. scand.* 150: 199 (1954)
4. SEITZ, L., LEWIS, S. M. AND GOODELL, A. W. Polycythemia vera and its treatment with radioactive phosphorus. *Quart. J. Med.* N. S. 23: 297 (1959)
5. THORPE, C. A. Increase in cell volume and pulmonary changes in polycythemia vera. *Acta med. scand.* 170: 443 (1961)
6. KROGER, T. Die Rolle der Blutvolumenvermehrung bei Polycythemia vera und ihre Veränderung bei Behandlung mit ^{32}P . *Z. ges. inn. Med.* 16: 1048-1052 (1961)
7. VILLANUEVA-MAYER, RÖSNER, H. UND HUBER, W. Kontrolle der Erythropoese: Ferrokinetik und ^{32}P Therapie bei Polycythemia. *Freiburger Symp. über Radioisotope in der Hämatologie*, Freiburg 1: 3. III. 1962
8. MOLLINOW, P. L.; VALLI, V. AND CUTLER, M. Red cell and plasma volume in newborn infants. *Arch. Dis. Childh.* 25: 242 (1950)
9. EMMERICH, S. The effect of congestive heart failure on blood volume as determined by radiochromium tagged red cells. *Jr.* 902 (1954)
10. VALLI, D. Blood volume changes in cyanotic congenital heart disease and polycythemia vera. *Circulation* 23: 749 (1961)
11. SALAF, D. B. AND SCHROEDER, T. Polycythemia in emphysema. *Quart. J. Medicine*, N. S. 30: 135 (1961)
12. SCHROEDER, S. S. Blood volume and heart disease. *Progr. cardiovasc. Dis.* 4: 363 (1962)
13. FREEDMAN, B. J. AND FISHBEIN, D. G. Erythrocytosis in Emphysema. *Brit. J. Haematol.* 9: 423 (1963)
14. HENCK, H., LEWIS, S. AND SEITZ, L. The influence of anaemia, polycythemia and splenomegaly on the relationship between venous haematocrit and red-cell volume. *Brit. J. Haematol.* 10: 567 (1964)
15. DACE, J. V. AND LEWIS, S. M. *Practical Haematology* 3rd ed. (Churchill, London 1963)
16. CHAPLIN, H.; MOLLINOW, P. L. AND VETTER, H. The body/venous haematocrit ratio: Its constancy over wide haematocrit range. *J. clin. Invest.* 32: 1305 (1953)
17. GARRY, L. AND VETTER, J. C. The amount of trapped plasma in high speed macrocapillary haematocrit centrifuge. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 13: 642 (1961)
18. LEWIS, A. Herz und Kreislauf bei Erkrankungen des Blutes und der blutbildenden Organe. *Handbuch der Inneren Medizin*, Band IX/9 (Berlin 1960)
19. KLEINWOLF, H. UND SCHRAEMANN, W. Zur Regulation des Blutvolumens bei Anämien. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 201: 266 (1954)
20. McFADYEAN, A. J. S., TODD, D. AND TAYLOR, K. C. Observations in the anemia of cryptogenic splenomegaly. *Blood* 13: 313 (1956)
21. BOWDLER, A. J. Dilution anemia corrected by splenectomy in Gaucher's disease. *Ann. Intern. Med.* 58: 664 (1963)

22. HUBER, H., LEWIS, S. M. und SEUR, L. S.: Anämie und Gesamtvolumen sinkender Erythrozyten bei Osteomyelosklerosen. *Klin. Wochr.* (im Druck).
23. HUBER, H. und SHIRAKURA, H.: Untersuchungen zu den Blutbildveränderungen bei Leberzirrhosen. *Blut* 11: 75 (1963).
24. ESKRIBER, S.: Blood volume in patients with acute glomerulonephritis as determined by radioactive chromium tagged red cells. *Amer. J. Med.* 27: 241 (1957).
25. VEREL, H. A., TURNBULL, G. R., TURNBULL AND ROSE, J. H.: Anaemia in Bright's disease. *Quart. J. Med.*, N. S. 28: 491 (1955).
26. VEREL, H.; BURY, J. D. AND HOPE, A.: Blood volume changes in pregnancy and the puerperium. *Clin. Sci.* 15: 1 (1956).
27. READ, H.: Anaemia in rheumatoid arthritis. *Canad. med. Ass. J.* 47: 781 (1952).
28. JAGER, B. V.; BROWN, H. AND NICKERSON, N.: Alterations in plasma proteins, plasma volume and volume of packed cells in patients receiving ACTH or cortisone. *Amer. J. Med.* 16: 181 (1954).
29. GOOLDER, A. W. G., GARTNER, J. M. AND SEUR, L.: Changes in interstitial fluid in polycythaemia vera. *Clin. Sci.* 27: 441 (1962).

Adressen der Autoren: Dr. H. Huber, Med. Univ.-Klinik Innsbruck (Österreich); Drs. S. M. Lewis und L. Seur, Depts. of Hematology and Radiotherapy, Hammersmith Hospital, London W 12 (England).

Libri

Joan W. Eichberger J *Laboratory Methods in Blood Coagulation*. Hoeber Med. Div. Harper & Row Publishers, New York and London. 93 p. 1963. \$ 2.95.

The author coagulationist at the Walter Reed Army Medical Center in Washington, describes in this little booklet briefly but clearly the detailed techniques for the pertinent tests in question. The instructive book can be recommended for technicians in the clinical laboratory.

G. Rossow New York

Ann Brecht Ozsena, *Manifestation of Iron Deficiency Akadémiai kiadó, Budapest 1963. 116 S., Preis Forint 60.*

Da chronischer Eisenmangel von atrophischen Schleimhautveränderungen begleitet sein kann, hat der Autor bei 63 Patienten mit Ozsena den Eisenhaushalt untersucht; 44 hatten eine Eisenmangelanämie und die übrigen einen latenten Eisenmangel. Die Behandlung der Ozsena mit Eisen war in den Händen des Autors erfolgreich. Im Tierversuch führt chronischer Eisenmangel über zwei bis drei Generationen zu histologischen Nasenschleimhautveränderungen, wie sie bei Ozsena beobachtet werden. Es sei dem Leser überlassen, die pathogenetischen Überlegungen des Autors und die Schlüsselstellung des Eisens in der Entstehung der Ozsena selbst zu beurteilen.

P. Farrer, Zürich

The Hemophilias. International Symposium Washington. Ed. R. M. Brinkhous. The University of North Carolina Press, Chapel Hill 1964, 412 p. \$ 7.50.

The book which contains the somewhat extended proceedings of the Conference on Hemophilia in 1963, is an excellent review of the present concept of the hemophilias. The papers presented by great number of participants are given and also the interesting discussions.

G. Rossow New York

Emmentle de Wolf *Etude clinique de 134 mongoliens. Supplémentum ad 202 Vol., Annales Paediatrici, S. Karger A. G. Basel/New York 1964.*

Die Monographie umfasst eine sorgfältige klinische Studie derjenigen Mongoloiden, welche 1945-1961 an der Aargauer Kinderklinik zur Beobachtung kamen. Besondere Aufmerksamkeit wird den ausgeprägten Anomalien und Mißbildungen, dem Leukämieproblem sowie der Ätiologie gewidmet. Prognose und soziale Probleme der Krankheit werden kurz besprochen.

G. S. Allen, Basel

Varia

XIth Congress of the International Society of Haematology

The XIth Congress of the International Society of Haematology will be held in Sydney, Australia, from August 21st to 26th, 1966.

Scientific programme. The scientific sessions will be held at the University of Sydney. The morning sessions will consist of two simultaneous plenary meetings and the afternoon sessions will deal with a wide range of topics in papers, symposia and round-table discussions. The following topics have been chosen for the plenary sessions: The lymphoid cell in health and disease; nutrition and anaemia; leukemogenesis: genetics; red cell metabolism; coagulation; red cell production and destruction; factors in thrombosis; leucocyte and platelet physiology; haemoglobin structure.

Language: Papers may be given in either English or French. There will be no simultaneous translations at this Congress. This is in accordance with the decision of the meeting of Councilors in Stockholm in 1964. However, it is planned to have available for members of the Congress at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to the *Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Haematology, 1 York St., Sydney N.S.W. Australia.*

XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion

The XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion will be held in Sydney, Australia, from August 24th to 29th, 1966. The Congress will follow immediately after the XIth Congress of Haematology and Joint Plenary Sessions have been arranged for Thursday, August 25th, and Friday, August 26th, 1966.

Scientific programme. It is planned to hold two plenary sessions each morning. The following subjects have been chosen for the plenary sessions, the first four being combined sessions with the Congress of the International Society of Haematology: Recent advances in blood genetics; white cell and platelet physiology; red cell metabolism; structure of haemoglobin; auto-immunity; extra-corporeal circulation; organ transplantation; plasma proteins. The afternoon sessions will be devoted to papers on selected subjects, e.g. new aspects of blood and serum groups; fractionation of blood; platelets in blood transfusion; automation in blood banks; coagulation disorders; immuno-haematology including haemolytic disease of the newborn; preservation of blood.

Language: Papers may be given in either English or French. It is planned to have available for members of the Congress, at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to the *Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion, 1 York St., Sydney, N.S.W. Australia.*

Clinique Médicale Universitaire, Lausanne (Directeur: Prof. A. VANDOTTI)

Les phosphatases leucocytaires alcaline et acides Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques

By Par J. A. ANTONIOLI, A. BAER et A. VANDOTTI

En 1930 UMBRO (36) et KAY (15) ont décrit l'existence dans le leucocyte de la phosphatase alcaline. Depuis lors, les variations d'activité de cette enzyme dans de multiples situations physiologiques ou pathologiques ont suscité de nombreuses recherches dont les résultats, en dépit de certaines contradictions, ont permis l'établissement de nombreux faits (43 25 16, 38, 39 40 41 42 3 44 45 46 30 31 13 14 20 21 32 33 17). La phosphatase alcaline n'existe chez les leucocytes que dans environ 25 % des granulocytes neutrophiles mûrs. L'activité de la phosphatase alcaline du neutrophile est abaissée dans certaines leucémies myéloïdes chroniques, dans la mononucléose infectieuse et dans l'hémoglobininurie nocturne paroxystique. Elle est augmentée lors d'infections, de stress, de carcinose, de cirrhose, de métaplasie myéloïde et de myélosclérose, de polycythémie vraie, de tumeurs et de fractures osseuses. Elle est augmentée également chez la femme lors de la deuxième et de la troisième semaine du cycle (5) et durant la grossesse (39 26 6). On a proposé le dosage en clinique de la phosphatase alcaline du neutrophile afin d'aider au classement des leucémies à monocytes (24) au diagnostic différentiel de la leucémie myéloïde chronique et des myélomes non leucémiques (42) au diagnostic différentiel de la polycythémie vraie et de la polyglobulie (40 22) au dépistage précoce des grossesses (12) au diagnostic du stade d'évolution du lymphogranulome malin (37).

ALTER *et al.* (1) ont émis une hypothèse, dont certains points ont déjà été vérifiés, et qui permet de tenter une explication générale des modifications d'activité de la phosphatase alcaline du neutro-

phile. Cette enzyme serait normalement sous la dépendance de 2 gènes, localisés sur la 21^e ou la 22^e paire chromosomique. L'absence de ces gènes caractériserait une maladie héréditaire, l'hypophosphatase, dans laquelle n'existe aucune activité de la phosphatase alcaline dans le granulocyte (4). La perte d'un gène pourrait être liée aux lésions chromosomiques de la 21^e ou 22^e paire relevées dans certaines leucémies myéloïdes chroniques et être la cause de l'activité phosphatasique abaissée décrite dans cette affection (23). L'existence de 3 gènes, suggérée par la trisomie de cette 21^e ou 22^e paire expliquerait l'augmentation de l'activité enzymatique dans le mongolisme (1). Au cours de la vie, l'activité enzymatique fondamentale du granulocyte, qui est sous l'étroite dépendance de sa structure génétique, peut être modulée, à l'intérieur de certaines limites, et par l'intermédiaire de mécanismes encore inconnus, par toute une série de facteurs, et plus particulièrement par des facteurs endocriniens. VALENTINI *et al.* (39) ont reproduit l'élévation de la phosphatase alcaline du neutrophile que l'on observe dans le stress en injectant de l'AGTH ou de l'hydrocortisone. BOREL *et al.* (5), en administrant de l'oestradiol, et CLARKE *et al.*, (7) en administrant un progestérone de synthèse (ENOVIM) ont provoqué une élévation de la phosphatase alcaline du neutrophile.

Même en admettant comme fondée cette tentative d'explication, il faut reconnaître que tous les facteurs humoraux de régulation du métabolisme leucocytaire n'ont pas été identifiés. De plus, comme la teneur en phosphatase alcaline augmente dans le granulocyte en cours de maturation, il faut tenir compte du fait qu'une libération massive par la moelle osseuse de neutrophiles jeunes, ou qu'une séquestration ou une libération de granulocytes mûrs par les tissus, peut modifier l'activité phosphatasique moyenne des granulocytes circulants (34-35).

La phosphatase acide leucocytaire a été relativement peu étudiée. Elle a été décrite dans les neutrophiles d'exsudat de lapin (8) et dans les neutrophiles d'homme (27) selon HAIGHT *et al.* (11) ce serait surtout une enzyme lymphocytaire selon BOREL *et al.* (5) elle serait presque deux fois plus active dans le polynucléaire que dans le lymphocyte. On trouve son activité abaissée dans la leucémie myéloïde aigüe et dans la leucémie lymphoïde chronique, alors qu'elle est normale dans la leucémie myéloïde chronique (38, 44-30). Elle est inchangée dans la polycythémie vraie (45-9) dans la

myélobiose (44) dans le lymphosarcome (30, 3) dans le lymphogranulome malin, le myélome, la métaplasie leucémoidé, l'éosinophilie (3) WILLIAMS *et al.* (44) l'ont trouvée augmentée dans l'anémie réfractaire leucopénique et thrombocytopénique et KERP-POLLA (16) dans l'anémie achrestique. La phosphatase acide leucocytaire demeure inchangée lors de leucocytoses infectieuses (38, 44) lors d'hémoglobininurie nocturne paroxystique (3) et lors de grossesse (26). Les cellules de Gaucher de la rate, dans la glycogénose, renferment une phosphatase acide très active (9).

Nous avons entrepris un travail de sondage clinique afin de poursuivre l'étude des facteurs humoraux qui règlent l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire. Nous voulons également connaître le comportement de la phosphatase acide en pathologie et voir si des modifications éventuelles de cette activité sont sous la dépendance des mêmes facteurs que celle de la phosphatase alcaline. Nous voulons de plus étudier la corrélation entre les phosphatases acide et alcaline du leucocyte et celles du plasma, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été fait systématiquement.

Matériel et méthodes

Chez 219 malades, choisis au hasard parmi les entrées à l'hôpital et classés selon le diagnostic clinique, on a dosé, selon la méthode biochimique de LOWRY (19) les phosphatases alcaline et acide dans les leucocytes isolés et homogénéisés (6) et dans le plasma. L'activité enzymatique est exprimée en μmol de p-nitro-phénol libérés par minute d'incubation à 37° par leucocyte (phosphatase acide) par granulocyte (phosphatase alcaline) ou par ml de plasma (phosphatase plasmatique).

Les limites de l'activité normale sont tirées d'un collectif de 40 témoins pour les phosphatases leucocytaires et d'un collectif de 20 témoins pour les phosphatases plasmatiques (moyenne arithmétique ± 2 déviations standard). Phosphatase alcaline neutrophilique, homme 2,02-3,78 10^{-6} femme 0-11,33 10^{-6} ; phosphatase acide, homme et femme 1,40-9,28 10^{-6} ; phosphatase alcaline plasmatique, homme et femme 23,08-88,68 10^{-6} phosphatase acide plasmatique, homme et femme 0-22,76 10^{-6} .

Notre sondage ne révèle aucun cas de valeur d'activité enzymatique nettement abaissée comme de plus chaque catégorie clinique ne renferme que peu de cas et que les augmentations d'activité mesurées sont souvent de grande amplitude, jusqu'à 10 fois la limite supérieure de la normale, nous avons renoncé à caractériser un groupe par son activité moyenne et nous nous contentons d'enregistrer des augmentations d'activité.

Résultats

Corrélation entre les augmentations observées. L'examen des résultats globaux (tableau I) permet de constater que sur 219 malades, 155 ont au moins l'une des valeurs dosées augmentée. Il s'agit, le plus souvent, soit d'une augmentation isolée de la phosphatase al-

Tableau I
Résultats globaux.
Malades examinés 219.

Augmentation d'au moins l'une des valeurs testées	155 cas	(70,8%)
Augmentation de la phosphatase alcaline neutrophilique	95 cas	(42,3%)
Augmentation de la phosphatase acide leucocytaire	74 cas	(31,8%)
Augmentation de la phosphatase alcaline plasmatique	57 cas	(26,0%)
Augmentation de la phosphatase acide plasmatique	31 cas	(14,2%)

Combinaisons des augmentations observées:

Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
	Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
29	+	n	n	n
26	+	+		n
21	n	+		
16	+	n	+	n
14	n	n	+	n
9	n	+	+	n
9	+	+		
8	n	n	n	+
7	+	n		+
5	n	n	+	+
5	n	+	n	+
5	+	+	+	+
2	+	n	+	+
1	+	+	n	+
11	n	+	+	+
64	n	n	n	n

219

Ph. alc. = phosphatase alcaline; ph. ac. = phosphatase acide.

Activité normale = n activité augmentée = +

caline leucocytaire, soit d'une augmentation simultanée des phosphatases alcaline et acide leucocytaires, soit encore d'une activation isolée de la phosphatase acide leucocytaire.

Si ces quatre activités enzymatiques variaient indépendamment l'une de l'autre, la probabilité d'apparition simultanée de deux valeurs augmentées serait égale au produit des probabilités d'apparition de chacune d'entre elles. Or les probabilités d'apparition d'augmentation simultanée de deux valeurs d'activité (matricielle prise deux à deux) telles qu'on les calcule à partir des probabilités observées d'apparition isolée et telles qu'on les enregistre effectivement sont très voisines l'une de l'autre (tableau II). Aucune corrélation n'apparaît donc entre ces quatre caractères.

Tableau II

Corrélations entre les augmentations d'activités enzymatiques observées.

P = probabilité de l'apparition d'une augmentation de l'activité enzymatique A = phosphatase alcaline neutrophilique; B = phosphatase acide leucocytaire C = phosphatase alcaline plasmatique D = phosphatase acide plasmatique.

Probabilités d'apparition, calculées en considérant les 2 caractères envisagés comme indépendants l'un de l'autre:

Probabilité d'apparition observée dans le collectif étudié

P(A) P(B) = 0,144
P(A) P(C) = 0,110
P(A) P(D) = 0,060
P(B) P(C) = 0,068
P(B) P(D) = 0,048
P(C) P(D) = 0,037

P(AB) = 0,178
P(AC) = 0,157
P(AD) = 0,059
P(BC) = 0,086
P(BD) = 0,041
P(CD) = 0,046

En classant les valeurs augmentées par catégorie clinique (tableau III) on retrouve dans chaque groupe une fréquence des augmentations qui ressemble fort à celle observée dans le tableau I. L'augmentation la plus fréquemment observée est celle de la seule phosphatase alcaline leucocytaire ou éventuellement l'augmentation simultanée des phosphatases alcaline et acide leucocytaires. On observe donc des variations des deux phosphatases leucocytaires dans les mêmes circonstances pathologiques.

Variations des phosphatases plasmatiques (tableau III et IV) Le 26 / des patients examinés présente une activité accrue de la phosphatase alcaline plasmatique. Ces augmentations s'observent dans les maladies du foie (ictère, cirrhose, troubles circulatoires, intoxications) dans les infections, lors de néoplasme (du poumon ou de l'estomac) d'infarctus du myocarde ou du poumon, du lymphogranulome malin. On en voit également dans des cas isolés d'affections digestives, de diabète, d'urémie, d'affections thyroïdiennes, d'anémie. Il s'agit alors souvent de patients atteints en même temps d'autres maladies ou l'on note une hyperphosphatasémie.

La phosphatase acide plasmatique est augmentée dans le 14,2 / de nos patients et selon une répartition clinique assez diverse: maladies du cœur et de la circulation, infections, maladies neurologiques, emphysemes, maladies digestives, diabète, maladies du foie. Aucun carcinome de la prostate avéré ne figure dans notre population.

Tableau III
Résultats par maladie.

Diagnose	Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
		Pl. alt.	Pl. no.	Pl. alt.	Pl. no.
Inuffisance cardiaque,	7	+	n	n	
hypertension, infarctus,	7	+	+	n	
ictus, artériosclérose	3	+	n	+	
	3	+	n	n	+
	2	+	+	+	
	1	+	+	+	+
	4	n	+	n	
	2	n	+	+	
	5	n	n	+	
	3	n	n	n	+
Maladies infectieuses	9	+	n	n	n
(phlébite, rhumatisme	6	+	+	n	
articulaire aigu,	5	+	+	+	
bronchopneumonie,	2	+	n	+	
glomérulonéphrite)	2	+	n	n	+
	1	+	+	n	+
	1	+	+	+	+
	5	n	+	n	
	2	n	+	n	+
	2	n	+	+	
	3	n	n	+	
	2	n	n	+	+
	1	n	n		+
Néoplasme pulmonaire	1	+	n	+	n
Néoplasme digestif	1	+	+	+	
	1	+	+	n	n
	1	n	+	n	n
Maladies pulmonaires	4	+	n	n	n
(emphysème, asthme	3	+	+	n	n
et infarctus)	2	+	n	+	n
	1	+	+	+	n
	1	+	n	+	+
	1	+	n	n	+
	2	n	+	n	n
	1	n	+	n	+
	4	n	+	+	n
	5	n	n	+	n
	1	n	n	n	+
Maladies digestives	3	+	n		
(gastrite, ulcère,	3	+	+	n	
iléite, troubles	1	+	n	n	+
fonctionnels)	2	n	+	n	
	2	n	+	n	+
	1	n	+	+	
	1	n	n	+	+

Tableau III (suite)

Diagnoses	Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
		Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
Maladies hépatiques	1	+	n	n	n
(ictère, cirrhose,	2	+	+	n	n
troubles vésiculaires)	2	+	+	+	n
	5	+	n	+	n
	1	+	+	n	+
	1	n	+	+	n
	1	n	+	n	n
	1	n	n	+	+
Maladies rénales	1	+	+	n	n
(adénome, urémie,	1	+	n	+	n
ptose, néphrose)	2	n	+	n	n
Ostéoporose	1	+	+		n
Osseux	1	+		n	n
Intoxications (alcool,	2	+	+	n	
CO souffères)	1	+	+	+	+
	1	+	n	+	+
	1	+	n	+	n
	2	n	n	n	+
Maladies neurologiques,	1	+	+	n	n
affections psychiatriques	2	+	n	+	+
	1	+	n		+
	1	+	n	+	+
	1	n	+	n	n
	2	n	n	+	n
	1	n	n	n	+
Maladies du sang	5	+		n	n
	1	+	+		n
	4	n	+	n	n
	1	+	n	+	
	2	n	+	+	n
	1	n	n	+	
Diabète, obésité	1	+	n	n	n
	1	+	+	+	
	1	+	n	+	+
	3		+		
	2			+	
Thyroïde (goitre,	2	+	n	+	
dysthyroïdisme, Basedow)	1	+	+	n	
	1	+	n		

Tous les malades de ces deux groupes figurent déjà dans d'autres rubriques.

Abréviations cf. tabl. I.

Variations des phosphatases leucocytaires (tableau III et IV) Les augmentations des phosphatases leucocytaires sont fréquentes (42,5 / des patients présentent une augmentation de la phosphatase alcaline et 33,8 / une augmentation de la phosphatase acide) elles surviennent dans de multiples circonstances cliniques, qui sont les mêmes pour les phosphatases alcalines et pour les phosphatases acides.

Discussion

Absence de corrélations entre les activités phosphatasiques mesurées Dans la population étudiée, les quatre activités enzymatiques mesurées varient indépendamment les unes des autres. Il ne semble donc pas, contrairement à ce que pensaient FRIEDINGER *et al.* (10) que les leucocytes puisent dans le plasma une part appréciable de leurs phosphatases. KERPPOLLA (16) avait pressenti cette indépendance, mais en se basant sur un collectif qui ne comportait que peu de valeurs sériques augmentées et à l'aide de techniques histochimiques qui ne décelaient à l'état normal aucune phosphatase dans le granulocyte. SIMOLA *et al.* (31) avaient remarqué que les augmentations de la phosphatase alcaline granulocytaire survenaient fréquemment chez des patients chez lesquels cette enzyme restait dans des limites normales dans le sérum.

Augmentation des phosphatases plasmatiques Les augmentations de la phosphatase alcaline surviennent le plus souvent chez des malades souffrant d'atteinte hépatique (ictère, cirrhose, stase veineuse, intoxications) d'infections, de néoplasme (du poumon ou de l'estomac) d'infarctus cardiaque ou pulmonaire, de maladie de Hodgkin, ce qui est conforme aux données de la littérature. On peut admettre avec RICHTERICH (28) que de telles augmentations sont le plus souvent le signe d'une atteinte du parenchyme hépatique ou d'une nécrose au sein d'un organe riche en phosphatase alcaline. L'observation d'un taux enzymatique élevé dans les «maladies digestives» peut faire soupçonner la présence de troubles hépatiques concomitants. L'hyperphosphatasémie relevée dans un cas d'urémie est-elle due à la libération d'enzyme par un rein lésé?

Parmi la population examinée, le 26 / des patients présentait une activité phosphatasique alcaline accrue dans le plasma. Ce pourcentage correspond à celui que trouvent BABSON *et al.* (2) (environ 30 / d'augmentation) qui a testé 2000 malades afin de détecter les cas d'hyperphosphatasémie.

Tableau IV
Résultats dans les maladies du sang

Diagnostic	Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
		Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
Anémie de Biermer	1	+	+	n	n
	1	n	+	n	
Anémie hypochromes	1	+		+	n
	1	n	+	n	n
Hodgkin	2	+		n	
	1	n	+	+	n
	1			+	n
Tumeur lymphatique réticulaire	1		+	n	
Lymphosarcome	1	n	+	n	n
Réticulosarcome	1	+	n		
Plasmocytome	1		+	+	
	1	+	n	n	
Myélome	1	+	n	n	

Abréviations cf. tabl. I.

Tableau V

Cas Sch., homme 59 ans, entré en clinique dans un état de coma respiratoire

Date	Evolution de l'acidose métabolique	Leucocytes		Plasma	
		Ph. alc.	Ph. acide	Ph. alc.	Ph. acide
4.12	Saturation 90% pH sanguin 7,16 pCO 105 mm Hg				
5.12	Saturation 88% pH sanguin 7,19 pCO ₂ 103 mm Hg	370,22	126,34	75,67	21,82
8.12		135,00	14,02	—	—
12.12	Saturation 83% pH sanguin 7,35 pCO 63 mm Hg				
17.12		4,67	5,80	69,56	4,49
18.12	pH sanguin 7,34 pCO 59 mm Hg				
23.2.		5,62	1,68	52,17	13,92
23.2	pH sanguin 7,44 pCO 46 mm Hg				

Les phosphatases leucocytaires sont exprimées en 10^{-6} μ mol/cellule/min; les phosphatases plasmatiques sont exprimées en 10^{-8} μ mol/ml/min.

On peut distinguer dans le plasma en tout cas deux types de phosphatases acides, celle dont l'activité est inhibable par l'acide $l\pm$ tartrique dont l'origine est prostatique, et celle que n'inhibe point l'acide tartrique, qui provient de divers organes, entre autres, des érythrocytes. L'intérêt diagnostique du dosage de la phosphatase acide dans le sérum consiste dans l'étude de la fraction prostatique de cette enzyme dont l'augmentation permet de dépister précocement un carcinome de la prostate (29)

Notre collectif ne contient pas de néoplasme prostatique avéré et nous n'avons envisagé que les augmentations de l'activité enzymatique totale à pH 5. Le foie joue probablement un rôle dans les augmentations d'activité lors d'intoxications, (sédatifs) d'insuffisance cardiaque, surtout lorsqu'on observe simultanément une élévation de la phosphatase alcaline. ROSENCRANTZ (29) publie une statistique de 49 cas d'augmentation de la phosphatase acide sérique. 25 de ces augmentations se voient chez des sujets non porteurs d'un carcinome de la prostate et parmi eux il y a des patients atteints de troubles hépatiques ou vésiculaires.

Augmentations de la phosphatase alcaline du neutrophile. L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline neutrophilique est fréquente. Elle se rencontre, conformément aux données de la littérature, lors d'infection, d'infarctus du poumon ou du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux, de cirrhose, de néoplasme. Mais nous l'avons également observée lors d'insuffisance cardiaque ou respiratoire, lors d'ictère ou d'hépatite, lors d'atteinte rénale (sclérose ou urémie) lors d'intoxication (alcool, CO somnifères) lors d'affections neurologiques ou psychiatriques mal définies, dans quelques cas isolés de diabète ou de troubles thyroïdiens.

Notre collectif ne renferme que peu de cas de maladies hémato-logiques. Dans deux cas d'anémie de Biermer on relève une fois une valeur augmentée et une fois une valeur normale. Dans cette maladie on a rapporté des valeurs normales (21) abaissées (32) ou élevées (25). Dans deux cas d'anémie hypochrome nous trouvons également une valeur augmentée et une valeur normale. Pour MERKER *et al.* (21) on y trouve des valeurs élevées, pour SIROLA *et al.* (31) des valeurs abaissées. Lors de lymphogranulome malin, nous observons deux cas avec des valeurs augmentées et deux cas avec des valeurs normales. HAYON *et al.* (14) KERPPOLA (16), SIROLA *et al.* (31) MERKER *et al.* (21) trouvent dans cette affection

des valeurs élevées, tandis que BECK *et al.* (3) n'y rencontrent que des valeurs normales. BOREL *et al.* (5) relèvent des valeurs normales en période de rémission et des valeurs augmentées lors de poussées hodgkiniennes. Alors que l'on décrit habituellement des phosphatases alcalines neutrophiliques normales (14-3) ou abaissées (30) dans les réticulosarcomes et les lymphosarcomes, nous observons un réticulosarcome et un plasmocytome avec une activité enzymatique accrue. Un cas de myélome présente une valeur phosphatase augmentée, conformément aux observations de PLUM (25) SIMOLA *et al.* (31) et de KERPPOLA (16) alors que BECK *et al.* (3) n'y trouvent que des valeurs normales.

Le rôle de la surrénale peut être évoqué pour expliquer une bonne partie des augmentations de la phosphatase alcaline du neutrophile. Ce rôle existe certainement dans l'infection et dans les situations aigües de stress. Lors de l'insuffisance hépatique, on peut invoquer un état d'hypercorticisme concomitant. Bien que l'on ignore encore le rôle fonctionnel exact de la phosphatase alcaline dans le métabolisme du leucocyte, on peut s'attendre à trouver une action importante de la cortisone sur ce métabolisme d'une cellule dont le rôle dans l'inflammation est primordial.

Les augmentations, souvent spectaculaires et dont le tableau V donne un exemple, pourraient être déclenchées par la baisse du pH sanguin. On expliquerait ainsi l'élévation observée par LAMOREUX (18) dans le coma diabétique et par WILTHAW *et al.* (46) dans les leucocytes incubés dans leur propre sérum ou dans une solution isotonique : dans ce dernier cas, la glycolyse leucocytaire acidifierait le milieu.

Augmentation de la phosphatase acide du leucocyte On admet généralement que la phosphatase acide du leucocyte ne varie guère dans les maladies autres que les affections hématologiques et même dans ce dernier groupe on n'a observé des activités accrues que dans certaines anémies (44-16). Notre sondage révèle au contraire que de telles augmentations sont fréquentes, qu'elles sont tout aussi peu liées à une entité clinique donnée que celles de la phosphatase alcaline du neutrophile et qu'elles s'observent, en gros, dans les mêmes affections que celles de cette dernière enzyme. La régulation de la phosphatase acide du leucocyte semble donc obéir à des mécanismes généraux, probablement humoraux, analogues à ceux dont dépend la phosphatase alcaline du neutrophile, mais dont on ne peut encore préciser l'identité.

Résumé

On a dosé biochimiquement l'activité des phosphatases alcaline et acide dans les leucocytes et dans le plasma de 219 malades différents. Les phosphatases alcaline et acide, leucocytaires et plasmatiques, varient indépendamment les uns des autres. Les augmentations d'activité de la phosphatase alcaline du neutrophile sont fréquentes; elles s'observent en général lors d'infection, d'infarctus du poumon ou du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux de cirrhose, de néoplasme, et notamment dans la phase aigüe du lymphogranulome malin mais elles surviennent également lors d'insuffisance cardiaque ou respiratoire, lors d'ictère ou d'hépatite, lors d'intoxication, lors d'insuffisance rénale, lors d'affections neurologique ou psychiatrique mal définies. La fréquence et l'importance des augmentations rencontrées dans l'insuffisance respiratoire font penser que l'on peut ranger l'acidose aux côtés des autres facteurs humoraux et endocriniens, actions de la surrénale et de l'ovaire, dont dépend la régulation de l'activité de cette enzyme. La phosphatase acide leucocytaire est également fréquemment augmentée: ces augmentations observent dans les mêmes circonstances cliniques que celles de la phosphatase alcaline du neutrophile.

Summary

By biochemical methods, the activity of alkaline phosphatase and of acid phosphatase has been measured in the leucocytes and the plasma of 219 patients. The variation in enzymatic activity in all four cases is mutually independent. Increased alkaline phosphatase activity in the neutrophils is of frequent occurrence; it occurs in cases of infection, pulmonary or myocardial infarction, cerebral vascular disturbances, cirrhosis, malignant tumor and in acute phases of malignant lymphogranulomas. Furthermore, increases have been noted in cardiac and respiratory insufficiency in jaundice and hepatitis, in renal failure, in poisoning, in ill-defined neurological and psychiatric diseases. The frequency and level of such augmentations in respiratory insufficiency have led us to believe that the activity of this enzyme is conditioned by acidosis, as well as by humoral and endocrine factors, especially by adrenal and ovarian hormones. The level of acid phosphatase in the leucocyte is also often increased: such increases occur in similar clinical conditions that give rise to augmentations of the alkaline phosphatase in the neutrophils.

Zusammenfassung

Bei 219 verschiedenen Patienten wurde die Aktivität der sauren und der alkalischen Phosphatase in den Leukozyten und im Plasma gemessen. Die Veränderungen der verschiedenen Phosphatasen in den Leukozyten und im Plasma sind voneinander unabhängig. Aktivitätssteigerungen der alkalischen Phosphatase im neutrophilen Leukozyten sind häufig. Sie finden sich bei Infektionskrankheiten, Lungen- und Herzinfarkt, cerebralen Zirkulationsstörungen, Lebercirrhose und Tumoren, besonders beim akuten Lymphogranulom. Außerdem ist die Aktivität erhöht bei kardialer oder respiratorischer Insuffizienz, Ikterus oder Hepatitis, Vergiftungen, Nierenkrankheiten, und bei unklaren neurologischen und psychiatrischen Affektionen. Die Häufigkeit und das Ausmaß der Erhöhungen bei respiratorischer Insuffizienz sprechen dafür, daß neben humoralen und endokrinen Faktoren (Nebennierenrinde und Ovar) die Blutsäure bei der Regulation der Aktivität dieser Enzyme eine Rolle spielt. Auch die saure Leukozyten-Phosphatase ist oft erhöht, und zwar bei den gleichen klinischen Zuständen wie die alkalische.

Bibliographie

1. ALTER, A. A.; LEE, B. L.; POURFAR, M. AND DOMKE, G. Studies of leukocyte alkaline phosphatase in mongolism possible chromosome marker. *Blood* 22: 163-177 (1963).
2. BARNOV, A. L., READ, P. A.; PHILLIPS, G. E. AND LUDWIG, H. F. Use of new assay in study of serum alkaline phosphatase levels in 2000 hospital patients. *Clin. Chem.* 6: 495-500 (1960).
3. BECK, W. S. AND VALENZUELA, W. N. Biochemical studies on leukocyte. II. Phosphatase activity in chronic lymphatic leukemia, acute leukemia and miscellaneous hematologic conditions. *J. Lab. clin. Med.* 39: 245-253 (1951).
4. BOREL, W. R., BENJAMIN, N. AND AMSTER, K. F. Absence of leukocyte alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia. *Blood* 14: 975-977 (1959).
5. BOREL, C., FREI, J. ET VANDOTTI, A. Etude enzymatique directe au niveau du leucocyte. *Helv. physiol. Acta* 16: C53-C55 (1958).
6. BOREL, C., FREI, J. AND VANDOTTI, A. Leucocyte metabolism in pregnancy. *Acta endocrin.* 35: 575-584 (1960).
7. CLINE, A. R. W., HENDERSON, W. L. AND FOSTER, J. J. Neutrophilic alkaline phosphatase test; review with emphasis on findings in pregnancy. *Amer. J. clin. Path.* 38: 95-103 (1962).
8. CRAW, D. M. AND ROBERT, R. J. Phosphatase of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Canad. J. Res.* E26-E27: 290-307 (1948-49).
9. CROCKER, A. G. AND LANDINO, R. J. Phosphatase studies in Gaucher's disease. *Metabol. clin. Exp.* 9: 341-362 (1960).
10. FRIEDBERG, N. ET BOYER, F. Les phosphatases des leucocytes. *Enzymologia* 1: 172-176 (1956).
11. HANOW, W. F. AND ROBERT, J. R. Acid and alkaline phosphatase in white cells. Data for the lymphocyte and the polymorphonuclear leukocytes of man and rabbit. *Blood* 5: 267-277 (1950).
12. HAPER, W. B. AND QUIGLEY, H. J. Alkaline phosphatase activity in granular leukocytes as test for early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 17: 238-242 (1961).
13. HATTORI, K. AND JENSEN, W. N. Studies on alkaline phosphatase. *Proc. 7th. Congr. Int. Soc. Haemat., Rome, 1958.*
14. HAYMON, F. G. J. AND QUAGLIANO, D. Cytochemical demonstration and measurement of leukocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by modified two-dye coupling technique. *Brit. J. Haemat.* 4: 373-389 (1956).
15. KA, H. D. Plasma phosphatase. I. Method of determination. Some properties of the enzyme. *J. biol. Chem.* 89: 235-247 (1930).
16. KEMPFLA, W. Observations on the phosphatase content of blood and bone marrow cells in normal and pathological hemopoiesis. *Blood* 6: 454-465 (1951).
17. KNOBLAUCH, M. Über die alkalische Phosphatase der neutrophilen Leukocyten. *Helv. med. Acta* 29: 143-155 (1962).
18. LAMPERT, K. Die alkalische Phosphataseaktivität der Blutzellen bei Leukosen und anderen pathologischen Zuständen. *Z. klin. Med.* 155: 176-190 (1956).
19. LOWRY, O. H., IN COLOWICK, E. P. AND KAPLAN, N. O. Methods in enzymology vol. IV p. 371. Acad. Press, New York (1957).
20. MEXNER, H. UND HEILMEYER, L. Die Bedeutung der alkalischen Leukocytenphosphatase bei Reaktionen und Erkrankungen des myeloiden Systems. *Schweiz. med. Wochs.* 82: 1051-1052 (1959).

21. MEUKOW, H. UND CHUN YIN HUI: Alkalische Phosphatase und Glycogensgehalt der reifen Neutrophilen im Verlauf von myeloplastischen myeloproliferativen Erkrankungen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 66: 1050-1056 (1961).
22. MITTAL, W. J., MENDICOFF, J. B. AND DAMSKER, W.: Alkaline phosphatase of various neutrophils in various polycythemia. New Engl. J. Med. 282: 1151-1153 (1959).
23. NOWELL, P. C. AND HUMPHREY, D. A.: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J. nat. Cancer Inst. 25: 85-93 (1960).
24. PERLHAC, P. E. AND FRICK, S. C.: Alkaline phosphatase activity of exudative leukocytes in acute leukemia. Blood 18: 572, 580 (1961).
25. PLUM, C. K.: Die alkalischen Phosphatasen in den Zellen des normalen und pathologischen Knochenmarkes und des peripheren Blutes. Acta haemat. 4: 73-80 (1950).
26. PRITCHARD, J. A.: Leucocyte phosphatase activity in pregnancy. J. Lab. clin. Med. 50: 432-436 (1957).
27. REEDWOLD, J. J. AND WELCH, J. B.: Histochemical methods applied to haematology. Blood. 3: 641-655 (1948).
28. RICHTERICH, R.: Enzymopathologie, Berlin 1958.
29. ROSENBERG, H.: Untersuchung über die saure Phosphataseaktivität. Helv. med. Acta. suppl. 23, vol. 20 (1953).
30. SALVINO, E.: Determination of enzymatic activity of the cells of acute and chronic leukemia by the Carlberg micromethod. Trans. 6th Congr. europ. Soc. Haemat., Copenhagen 1957 (Karger Basel/New York 1958).
31. SIEOLA, J. AND SIEOLA, K.: A histochemical study of alkaline phosphatase in the leukocytes of blood and bone marrow in various diseases. Acta haemat. 18: 314-324 (1957).
32. TAKAKA, K. R., VALENTINE, W. N. AND FREDERICKS, R. E.: Diseases of clinical conditions associated with low leukocyte alkaline phosphatase. New Engl. J. Med. 282: 912-918 (1960).
33. TOYODA SUMIKI: Studies on leukocyte alkaline phosphatase. J. Kyushu haemat. Soc. 10: 565-565 (1960).
34. TRUBOWITZ, S., FELDMAN, M. A., BENNETT, E. AND HUNT V. M.: The alkaline phosphatase content of human leukocytes following marrow suppression by nitrogen mustard. J. Lab. clin. Med. 52: 259-263 (1958).
35. TRUBOWITZ, S.; MOSCHES, E. AND FELDMAN, D.: Alkaline phosphatase activity of the polymorphonuclear leukocyte in rapidly induced leucopenia and leukocytosis. J. Lab. clin. Med. 57: 747-754 (1961).
36. UNGER, M.: Studien über Phosphatase. V. über die Glycerophosphatase der Leukocyten im Blut. Biochem. Z. 231: 339-345 (1930).
37. VANNOTTI, A., BOERI, CL., FREI, J., CHANCE, I. ET RYDER, H.: Etude de l'activité enzymatique du leucocyte en physiopathologie humaine. Proc. 7th Congr. int. Soc. Blood Transfusion, Rome 1958 (Karger Basel/New York 1959).
38. VALENTINE, W. N. AND BECK, W. S.: Biochemical studies on leukocytes. I. Phosphatase activity in health, leukocytosis and myelocytic leukemia. J. Lab. clin. Med. 38: 39-55 (1951).
39. VALENTINE, W. N., FOLETTI, H., HARDY, E. B., BECK, W. S. AND LAWRENCE, J. S.: Studies on leukocyte alkaline phosphatase activity: relation to 'stress' and pituitary adrenal activity. J. Lab. clin. Med. 44: 219-228 (1954).
40. VALENTINE, W. N.: The enzymes of leukocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 59: 1003-1011 (1955).
41. VALENTINE, W. N., FOLETTI, J. H., SOLOMON, D. H. AND RYDER, J.: The relationship of leukocyte alkaline phosphatase to 'stress' to ACTH and to adrenal 17-OH-corticosteroids. J. Lab. clin. Med. 49: 723-737 (1957).

42. VALENTINE, W. N.: The metabolism of the leukemic leucocyte. *Amer. J. Med.* **28**: 699-710 (1960)
43. WACHSTEIN, M. Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. clin. Med.* **31**: 1-17 (1946)
44. WILLIAMS, M. J. AND MENDEN, J. L.: Studies on the alkaline and acid phosphatase content of leucocytes in various haematological disorders. *Texas Rep. Biol. Med.* **12**: 429-437 (1954)
45. WILLIAMS, M. J. AND MENDEN, J. L. Polycythemia vera terminating with myeloblastic leukemia. Correlation of morphologic findings with leucocytic phosphatase studies. *Blood*, **9**: 89-195 (1954).
46. WITTEBAY, E. AND MORGENTHAU, W. C. Histochemical and biochemical studies on leucocyte alkaline phosphatase activity. *Blood* **10**: 1120-1131 (1955)

Adress des auteurs: Drs. J. A. Antonelli, A. Rees et A. Vannucci, Clinique Médicale Universitaire, Louvain (Belgique).

Ans der Medizinischen Klinik mit Poliklinik der Universität Erl.
(Direktor Prof. N. HANSEN)

Zur Charakterisierung von Myelomproteinen und Makroglobulinen

Von F. SCHEFFARTH, H. GÖTZ und H. LUTZ

Die im Plasma Myelomkranker auftretenden atypischen
Weißkörper sind seit Kenntnis dieser Proteine Gegenstand ma-
ßgebender Untersuchungen, wie die bis heute nahezu unüberseh-
bare einschlägige Literatur beweist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die verschiedenen Myelom-
typen mit Methoden zu charakterisieren, die einer Klinik auch zur
routinemäßigen Diagnostik zur Verfügung stehen. Im einzelnen
sollten die atypischen Proteine auf Grund ihrer elektrophoretischen
Wanderungsgeschwindigkeit in zwei verschiedenen Medien – Papier
sowie Agarose – auf Grund von Färbungen und Fermentnachweis-
methoden sowie auf Grund von immunologischen Reaktionen mit
Antihuman und Antimyelomserum beurteilt werden, um Auf-
schlüsse hinsichtlich ihrer Eiweißnatur und ihrer Beziehungen zu
physiologischen Proteinsystemen im menschlichen Serum zu erhal-
ten. Darüber hinaus sollten die differentialdiagnostisch verwertbaren
Kriterien der verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Bestim-
mung einzelner Proteintypen in Myelomserum und zur Abgrenzung
gegen pathologische Makroglobuline herausgestellt werden.

Literaturverzeichnis

- Insgesamt wurden sechs Myelomserum und ein Makroglobulinserum analysiert.
1 α_2 -Myelom (RI), 2 β_2 -Myelom (NI), 3 γ_1 -Myelom (SI), 4. kon (FI)
5 γ_2 -Myelom (RI) 6 γ_3 -Myelom (MI) 7 γ_4 -Myelom (LI), 8. (PI)
9 γ -Myelom (SI) 10 Makroglobulinämisches Serum (FI).

Die hier aufgeführte Typisierung der untersuchten Myel-
der papierelektrophoretischen Konstellation.

Ed



Abb. 1
Alb. α_1 α_2 β γ -Glob.
|
 γ -Mycelproteine

Ed



Abb. 1b
Alb. α_1 α_2 β γ -Glob.
|
 β -Mycelproteine

Ed

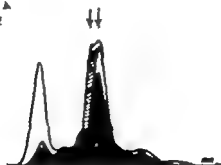


Abb. 1
 α_1 α_2 β γ -Glob.
|
 β -Mycelproteine

bedingt durch das Phänomen
des «fleckförmigen Glanzes»
Kontrolluntersuchung des Serums
der Abb. 1b nach 6 Monaten.

Abb. 1a-c zeigt die Diagramme der papierelektrophoretischen Analysen an verschiedenen Mykosen nach Protein-, Kohlenhydrat- und Lipoprotein-Färbung. Abb. 1a γ -Typ, Abb. 1b und 1c β -Typ zu verschiedenen Krankheitsphasen.

□ Protein- ■ Kohlenhydrat- ▨ Lipoprotein-Färbung

Methodik

1. *Papierelektrophorese* mit nachfolgender Protein-, Glykoprotein- und Lipoproteinfärbung, wobei methodisch nach den Angaben von GRABMAYR und HANCO (13, 14) vorgegangen wurde. Einzelheiten über die verschiedenen Färbetechniken finden sich unter anderem bei HEVETZ (15) und SCHNEFFART (42).

2. *Elektrophorese im Agarosegel*, jeweils im Vergleich mit einem Normserum a) mit nachfolgender Protein-, Glykoprotein- und Lipoproteinfärbung, b) mit anschließendem Nachweis der Oxydase-, alkalischen Phosphatase- und Amylase-Aktivität.

Die elektrophoretische Auftrennung der Seren im Agarosegel wurde in klassischer Weise nach GRABMAYR und WILLIAMS (12 und 12b) vorgenommen. Für die zusätzlichen Reaktionen (Färb- und Fermentreaktionen) sind folgende Literaturangaben nutzbar: rückfärbige Protein- und Lipoproteinfärbung (52, 54) Glykoproteinfärbung (45, 53, 54) Oxydaseaktivität (44, 50, 51) alkalische Phosphatase (47) Amylase (9, 43).

3. *Immunologische Untersuchungen.* a) Kreuzreaktionen im Ouchterlony-Schleimtest, wobei auch hier nach dem einschlägigen Schrifttum vorgegangen wurde (33). Im einzelnen wurde von dem, jeweils im Verhältnis 1 : 1 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnten, Antigen bzw. Immunsorum 0,05 ml in jede Aussparung eingebracht. Diffusion und Präzipitationsreaktion fanden bei *Lalaustrichomyces* statt. Als Immunsoren kamen handelsübliche Antihuman- sowie Antimykomen sowie ein selbst hergestelltes Antimykomen (s. u.) zur Anwendung. b) *Immunoelektrophorese* nach GRAHAM und WILLIAMS (s. o.) ebenfalls unter Verwendung von Antihuman- und Antimykomen.

4. *Herstellung des Antimykomens.* Ein Kanarienvogel wurde mit einem Mischserum von Myelomkranken der Typen β , γ und γ_2 in folgender Weise sensibilisiert. Innerhalb von 42 Tagen wurden insgesamt 8 ml des unverdünnten Mischserums, in der Regel zu je 0,5 ml jeden zweiten Tag i. v. appliziert. Außerdem wurde am 4. und am 60. Tage der Injektionserie je ein ml Depot von 3 ml Mischserum und 2 ml Freund'schem Adjuvant[®] gesetzt. Das Ausmaß der Präzipitatbildung wurde im Ouchterlony-Schleimtest geprüft.

Ergebnisse

1. *Die Papierelektrophorese* mit anschließender Proteinfärbung diente im wesentlichen der Typisierung der Myelomseren. Eine nähere Beschreibung der hier erhobenen Befunde erübrigt sich, da es sich um ausgeprägte Myelomseren handelt, deren papier-elektrophoretische Kriterien hinlänglich bekannt sind.

Ungeachtet der elektrophoretischen Position der hier untersuchten Seren zeigte sich bei *Glykoproteinfärbung* eine intensive Darstellung der jeweils atypischen Fraktion. Besonders auffällig war dabei der hohe Glykoproteidgehalt des Myelomproteins im Serum Fra (γ -Typ) und im Serum R6 (β -Typ). Auch mit der *Lipoproteinfärbung* konnten alle Myelomfraktionen dargestellt werden. Allerdings waren die pathologischen Fraktionen nur bei vier Myelomseren intensiver angefärbt, während bei allen übrigen eher ein redu-

zierter Lipoproteidgehalt des Myelomproteins aufzuzeigen war (Abb 1a - c)

Im Falle der Makroglobulinämie fand sich eine nur gering konzentrierte atypische Fraktion ganz in der Nähe der Auftragestelle, die jedoch bei der Glykoproteidfärbung auffallend stark in Erscheinung trat. Auch die Lipoproteidfärbung ließ an dieser Stelle eine relativ deutliche Anfärbung erkennen (Abb 2)

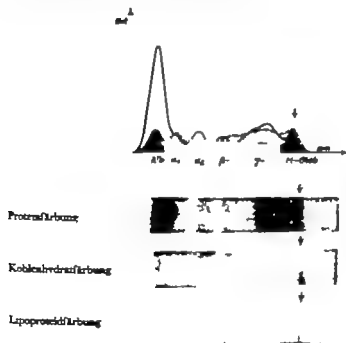


Abb 2 Diagramme der paperelektrophoretischen Analysen eines Serums mit Makroglobulinämie WALDERREUSE, wobei im γ -Globulin-Bereich bis zu 3 Komponenten abgrenzbar sind, eine unter ihnen imponiert als scharf begrenzte Fraktion mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit als die übrigen — sie bleibt praktisch an der Auftragestelle liegen. Sie läßt sich sowohl mit Scharlachem Reagens als auch mit Sodanschwarz B zur Darstellung bringen

2. Bei der *agarelektrophoretischen Untersuchung* der Myelomseren war eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der atypischen Proteine, auch unter den papierelektrophoretisch gleichartigen Typen auffällig. So lag nach Beendigung des Trennvorganges und Färbung mit Amidoschwarz 10B die Myelomfraktion des Serums Sai (γ -Typ) ausschließlich und scharf begrenzt im γ -Be-

reich, die des Serums Lo (γ_x -Typ) im β_x -Bereich, die des Serums Fra ($\gamma\backslash$ Typ) mit langer Fahne im β_2/γ -Bereich das Myelomprotein des Serums R₁ ($\gamma\backslash$ Typ) wanderte nur gering in die Zone der β_1 -Globuline und blieb zum Teil an der Auftragestelle liegen die Myelomfraktion des Serums Se (γ_x -Typ) lag im Bereich der β_1 -Globuline und reichte bis in die Gruppe der β_x -Globuline bei dem als $\beta\backslash$ Myelom klassifizierten Serum R₀ lag die pathologische Fraktion im β_1 bei dem als β_x -Myelom definierten Serum N₀ im β_2/γ -Bereich das Myelomprotein im Serum Prä (γ_x -Typ) war in zwei Fraktionen aufgespalten, wovon die größere im γ - die kleinere im γ_x -Bereich nachzuweisen war Bei dem Serum mit Makroglobulinämie WALDENSTRÖM war die atypische Fraktion nur knapp kathodisch von der Auftragestelle liegengeblieben.

Mit *Schiff'schem Reagens* ließen sich die Myelomproteine in den beschriebenen Positionen intensiv anfärben. Auffällig war der hohe Glykoproteidgehalt des atypischen Proteins im Serum R₁ ($\gamma\backslash$ Typ). Bei der Lipoproteinfärbung mit *Sudan schwarz B* fiel im Bereich der Myelomproteine, ungeachtet welchen Typs, eine scharfe Aussparung auf, während die im α Bereich gelegenen Komponenten derselben Seren stärker angefärbt waren als von Normalseren gewohnt. Lediglich in drei Fällen (Seren R₀ Prä, Fra) ließ sich im Zentrum der ausgesparten Myelomproteine eine schwache Blaugraufärbung erkennen.

Mit der *Peroxydaserreaktion* ließ sich im Bereich der α_x -Globuline, des Auftragesstriches und im Falle der Seren Prä, Se und Sa₁, fraglich auch im Bereich der Paraproteinfraktion, eine Braunfärbung darstellen.

Die *alkalische Phosphataserreaktion* konnte in allen Seren ausschließlich in der α_2 Fraktion nachgewiesen werden, wobei die Intensität in nur einem Falle (Serum Fra) stärker ausfiel als von Normalseren gewohnt. Das Serum mit Makroglobulinämie dagegen wies eine deutlich höhere alkalische Phosphataseaktivität auf, gemessen an der Farbreaktion.

Bei der Untersuchung der Seren auf *Amylaseaktivität* waren in allen hier untersuchten Fällen im Bereich der β_2/γ -Globuline deutlich zwei Komponenten darzustellen. Ein qualitativ wie quantitativ gleichartiger Befund war bei der Makroglobulinämie wie bei Normalseren zu erheben.

3 Immunologische Ergebnisse Im OUCHTERLONY-Schalentest war festzustellen daß bei Ansatz der Patientenserum gegen Antihuman-

serum (Anti Normalserum) in allen Fällen eine relativ hohe Anzahl von Präzipitationslinien sichtbar wurde, von welchen die eine oder die andere mit dem vergleichsweise angesetzten Normalserum eine Kreuzreaktion bot. Bei Gegenüberstellung von β - und γ -Myelomseren waren ebenfalls einzelne Kreuzreaktionen offensichtlich (Abb. 3). Unter Verwendung des selbst hergestellten Antimyelom-

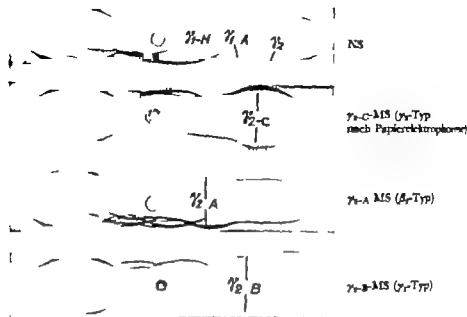


Abb. 3. Ouchterlony-Diffusionstest zur vergleichenden Analyse eines γ - und eines β -Myelomserums gegen ein Antihumanserum (Anti-Normalserum). Man erkennt deutlich neben Identitätsphänomenen Spornbildungen sowie Kreuzreaktionen, die eine partielle Identität bzw. eine Heterogenität verschiedener Systeme beweisen.

serums fiel lediglich mit einer Probe während der ersten Sensibilisierungsphase (am 10. Tage nach Sensibilisierungsbeginn abgenommen) auf, daß gegen das Serum eines Gesunden keine Präzipitate, gegen das Serum eines Patienten mit β - und gegen das eines Patienten mit γ -Myelom jedoch ein bis drei Komponenten nachweisbar wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich auch gegen ein Normalserum eine mehrfache Präzipitationsreaktion, teilweise Identitätsphänomene, teilweise Kreuzreaktionen mit den Präzipitaten des spezifischen Antigen-Antikörpersystems des Normalserums zeigten. Darüber hinaus ergaben sich auch Präzipitationsbildungen zwischen den verwendeten Immunsereen, Antihumanseren von der Ziege und Antimyelomseren vom Kaninchen. Die angesetzten Proben der verschiedenen Myelomseren gegen ein handelsübliches Antimyelomserum zeigten in allen Fällen Präzipitatbildungen, die mit den spezifischen Präzipitaten des Normalserums gegen Antihuman (Normal) serum immunologische Identitätsreaktionen aufwiesen.

Die Ergebnisse der Immunelektrophorese haben gezeigt, daß einerseits ein Antihumanserum alle hier untersuchten anti-

AMS → Alb. α_1 - α_2 β γ -Glob.



Erklärung: AMS = Antimyelomaserum, AHS = Antihumanserum (Anti-Normalserum) NS = Normalserum, MS = Myelomaserum.

γ_2 -A = γ_2 -Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des ersten Drittels der γ Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

γ_2 -B = γ_2 -Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des mittleren Drittels der γ Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

γ_2 -C = γ_2 -Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des letzten Drittels der γ Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

Abb. 4 Immunoelektrophoretische Analysen dreier verschiedener Mykomaerum im Vergleich zu dem Serum eines Gesunden unter Verwendung eines Antihumanserums sowie eines Antimyelomserums.



Abb. 5 Immunoelektrophorese eines Serums mit Makroglobulin vom Waldenström, wobei das pathologische Makroglobulin offensichtlich in nur geringer Konzentration vorliegt (vgl. auch Abb. 21)

Myelomproteine unter Bildung eines charakteristischen Präzipitates zur Darstellung bringt diese Präzipitate der Myelomproteine unter scheiden sich allerdings in Position, Form und Intensität sowohl untereinander als auch von physiologischen Proteinsystemen. Andererseits vermag ein Antimyelomserum neben den Myelomproteinen auch physiologische Komponenten auszufälligen es handelt sich dabei um Fraktionen des α , β - und γ -Globulin Bereiches wie auch um Albumin (Abb. 4).

Das hier untersuchte Makroglobulinserum, das allerdings nur einen sehr geringen Anteil an hochmolekularem Protein besaß wie mit einem Antihumanserum im OUCHTERLOFF-Schalentest, abgesehen von den normalen Eiweißsystemen, keine besonderen Kriterien auf. Immunelektrophoretisch war die für eine Makroglobulinämie WALDENSTRÖM typische $\beta_{1\gamma}$ -Linie nicht nachweisbar. Dagegen zeigte sich im Bereich der Auftragstelle eine Präzipitatbildung die dem gering konzentrierten, nicht gewanderten und auch nicht diffundierten Makroglobulin entsprach (Abb. 5). Gegen die verwandten Antimyelomsera kam es jedoch nicht zu einer spezifischen Präzipitationsreaktion im Bereich des Makroglobulins.

Diskussion

Die vorliegenden elektrophoretischen Ergebnisse zeigen unter Einbeziehung der Kohlenhydrat- und Lipoproteinfärbungen, daß die Myelomproteine, unabhängig von ihrer elektrophoretischen Position, im wesentlichen Glykoproteinnatur besitzen. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Autoren (6, 22a-b, 26, 30, 31, 33, 36, 37, 57, 60). Nach LAURELL und Mitarbeitern (23) ist der Kohlenhydratanteil der von ihnen untersuchten Myelomproteine verschiedenartig. Nach eigenen Erfahrungen beträgt der Anteil der Glykoproteinkomponente der verschiedenen Myelomproteine im Vergleich zur korrespondierenden Serumweiß-Fraktion zwischen 55 und 100%. Auf Grund von chemischen Bestimmungen der Serumpolysaccharide ist der Kohlenhydratreichtum der Myelomproteine auf eine starke Vermehrung der Hexosen zurückzuführen (31, 33). Einige Autoren sehen in der Kohlenhydratanreicherung der Myelomfraktionen, und im übrigen auch des Paraproteins beim WALDENSTRÖM, ein differentialdiagnostisches Kriterium gegenüber anderen atypischen Proteinfraktionen, etwa bei Tumoren und

Systemerkrankungen (22 a-b 36) bei welchen sie einen relativ schwachen Kohlenhydratanteil fanden. Das gleiche gilt zur Abgrenzung gegenüber physiologischen Globulinen (60)

Die Beobachtungstatsache, daß bei KH Färbung der Myelomproteine im Vergleich zu Normalproteinen ein Unterschied des Farbtones in Richtung des violetten Spektrums angetroffen wird wie dies im übrigen auch KUTS und HARTMAN (22) hervorheben, ist u. E. nicht nur als Intensitätseffekt, sondern als Qualitätsunterschied aufzufassen.

Neben dem Kohlenhydratreichtum der Myelomfraktion selbst fiel in den meisten der hier untersuchten Seren eine, gegenüber der Norm stärkere Anreicherung der α_2 -Glykoproteide auf, wahrscheinlich als Ausdruck eines allgemein reaktiven Prozesses. Gleiche Befunde werden bekanntlich auch bei akut-entzündlichen plasmazellulären und lymphoretikulären Reaktionen bzw. bei Systemerkrankungen, sowie bei malignen vorwiegend generalisierten Tumoren angetroffen.

Die Beobachtung daß auch bei der Lipoproteidfärbung auf Papier im Bereich der Myelomfraktion eine deutliche, vielfach scharf begrenzte Komponente zur Darstellung gelangt, beweist eine gleichzeitige Anreicherung dieses atypischen Proteins mit Lipiden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Untersucher (18, 22 a-b 24 38, 41 55)

Bei diesen Färbegergebnissen sind jedoch gegenüber Normalbefunden zwei Besonderheiten hervorzuheben. Die eine besteht darin, daß im Bereich der typischen Proteinkomponente ein intensiver fettiger Niederschlag sichtbar wird, der zur zum Teil mit Sudan schwarz anfärbbar ist. Dieses Phänomen wird auch in der einschlägigen Literatur erwähnt und wird auf eine acetonal unlösliche Lipoidfraktion der Myelomproteide zurückgeführt (38, 41 56). Die Lipidanreicherung im Bereich der Myelomfraktion soll vor allem in einer Anreicherung von Neutralfetten bestehen (56). Die andere Besonderheit besteht darin, daß das gleiche Phänomen des nicht homogen anfärbbaren Fettflecks im Albuminbereich zu beobachten ist. Hier handelt es sich mit Wahrscheinlichkeit um eine Vermehrung von schnell wandernden α -Lipiden.

Bei Makroglobulinämie WALDENSTROM ließ sich die atypische Serumkomponente ebenfalls als Glyko- und Lipoprotein charakterisieren. Dabei erschien der relative Kohlenhydratgehalt im Vergleich zu den Myelomproteinen wesentlich höher wenn auch die Fraktion im vorliegenden Beispiel einen nur geringen Anteil des Serumspektrums ausmachte. Diese differentialdiagnostisch bemerkenswerte Beobachtung wird von einigen Autoren bestätigt (5 20 23 42). Man darf diese Tatsache wohl in Relation zum Molekulargewicht der entsprechenden Eiweißkörper setzen, wo-

nach schwere Proteine einen wesentlich höheren Kohlenhydratgehalt besitzen als solche mit einem niedrigeren Molekulargewicht (5). Gemessen an der Anfärbbarkeit mit Sudanschwarz erschien auch der Lipidgehalt der Makroglobulinfraktion im Vergleich zu Myelomproteinen höher; außerdem fehlte das Phänomen mit dem fett fleckähnlichen Glanz (59).

Bei Vergleich der papierelektrophoretischen Ergebnisse mit den Befunden der Elektrophorese im Agargel zeigt sich, daß die verschiedenen Typen der Myelomproteine im Agargel, sowohl in ihrer elektrophoretischen Mobilität, als auch in der Differenzierung ihrer Proteinkomplexe, deutliche Unterschiede aufweisen, eine Beobachtung die auch von BREDA UND GASPAR (2) mitgeteilt wird. Allerdings konnten WALDENSTRÖM *et al.* (55) bei ihren Vergleichsuntersuchungen von Myelom- und Makroglobulinseren auf Papier und im Agargel keine erhebliche Diskrepanz finden.

Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im Agargel gegenüber dem Papier weist auf eine unterschiedliche Beschaffenheit der Myelomkomplexe hin. Agar als Trägermedium bietet hier infolge seiner Gitterstruktur ein besseres Auflösungsvermögen als Papier wobei nicht nur die Molekülgröße sondern auch dessen Struktur von Bedeutung sind. Bekanntlich lassen sich auf diese Weise insbesondere makromolekulare Proteine von solchen mit niederen Molekulargewichten differenzieren. In den oben beschriebenen Myelomfällen, in welchen, abweichend vom papierelektrophoretischen Befund, zusätzliche Eiweißsysteme im Bereich der Auftragstelle der Agarelektrophorese nachzuweisen waren, ist eine Beimengung von Makroglobulinen wahrscheinlich. Auf derartige Gegebenheiten wurde bereits auf Grund von Ergebnissen mit der Ultrazentrifuge hingewiesen (38, 58). Dies bestätigt auch die Glykoproteidfärbung, bei welcher besonders die starke Anfärbung des Serums R₁ beeindruckte, dessen atypisches Protein an der Auftragstelle liegenblieb bzw. nur gering kathodisch wanderte. Die relativ wenigen Angaben in der Literatur über gezielte Agargeluntersuchungen von Myelomseren mit besonderer Berücksichtigung der Glykoproteide bestätigen diese Beobachtungstatsache (1, 53).

In Diskrepanz zu den papierelektrophoretischen Ergebnissen stehen die Resultate der Agarelektrophorese mit nachfolgender Sudanschwarzfärbung. Wie bereits beschrieben, läßt sich im Agar keine oder allenfalls eine Spur von Lipoidfärbung im Bereich der

atypischen Proteinfraktion nachweisen. BALLIEUX (1) hat gleiche Befunde beschrieben. Auch bei Makroglobulinämien lassen sich im Bereich der atypischen Fraktion keine sudanophilen Anteile nachweisen, wie dies auch URJEL (53) mitteilt. Dieses Phänomen im Agar hängt mit der bekannten Eigentümlichkeit der Lipoproteide zusammen, daß diese sich aus offenbar lockerer Bindung von ihrem Trägerprotein lösen, weit anodisch wandern und sich vorwiegend im α_2 -Bereich, gering konzentriert auch in der Zone des Albumins und der Präalbumine niederschlagen. Dabei erscheint die Intensität dieser Lipoproteidkomponenten größer als die in Normalseren. Bei Vergleichen mit Direktbestimmungen in Myelomseren, sowie mit den papierelektrophoretischen Ergebnissen, dürfte die Wahrscheinlichkeit von Lipideigenschaften der Myelomproteide nicht in Zweifel gezogen werden. Die verschiedenen besonderen Phänomene auf Papier wie in Agar lassen jedoch auf die Möglichkeit schließen, daß es sich bei der Anreicherung von Lipiden um eine andersartige Zusammensetzung des Myelom-Lipoproteids handelt als bei physiologischen Serumlipiden.

Über die Beobachtungstatsache, daß die an die Coeruloplasmfraktion gebundene Oxydasereaktion zumeist verstärkt ausfällt, wurde bereits an anderer Stelle berichtet (8 44)

Bei den erwähnten Befunden mit Erhöhung der alkalischen Phosphataseaktivität handelt es sich um Patienten mit erheblichen Knochenveränderungen. Es ist anzunehmen, wie im übrigen auch in der Literatur diskutiert wird (25 29) daß die alkalische Phosphatase im allgemeinen im Normalbereich bleibt und erst bei Komplikationen erhöht ist.

Die Amylaseaktivität scheint auf Grund vorliegender rein qualitativer Ergebnisse keine Abweichungen gegenüber der Norm aufzuweisen. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die Paraproteine keine Fermentaktivität besitzen.

Die immunologischen Resultate mit Hilfe der verschiedenen Geltechniken haben gezeigt, daß Myelomweißkörper keine unschütterlichen Kriterien als «Paraproteine» gegenüber physiologischen Globulinen zeigen, wie dies vielfach behauptet worden ist. Zumindest bestehen partielle Immunitätsreaktionen zwischen den genannten Eiweißgruppen. Dies wird damit bewiesen, daß spezifische Antimyelomseren neben dem atypischen Protein auch die physiologische Fraktion auspräzipitieren, und daß Antinormalseren

auch die unter pathologischen Bedingungen entstandenen Eiweißkomponenten zur Darstellung bringen. Die verschiedenen Konstitutionstypen, die sich durch ihre unterschiedliche papier und agar elektrophoretische Mobilität differenzieren lassen, zeigen sowohl gegen Antihumanserum als auch gegen die Antimyelomseren gleiche Präzipitationsäquivalente. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß zwischen den verschiedenen Myelomtypen hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften keine Unterschiede bestehen. Zu gleichartiger Auffassung gelangten auch andere Autoren (3 19 21 27 28, 32, 34 46 48)

Erweiterte immunologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Myelomproteine sich immunologisch wie physiologische Serum eiweißkörper des β/γ -Systems (einschließlich der Subfraktionen β_{2-4} und $\beta_{2-4\mu}$) verhalten, die jedoch die dieser Gruppe eigenen spezifischen Antikörpereigenschaften verloren haben (10). Man erklärt dies durch eine abnorme Primärstruktur. Es fehlt ihnen ein Teil der Antigen determinanten der entsprechenden Immunglobuline, sie verfügen jedoch offenbar über individualspezifische bzw. gruppenspezifische Antigen determinanten, die die normalen Immunglobuline wiederum nicht besitzen (4 11 16 39 40 49). Die Kreuzreaktion zwischen Makroglobulinseren, Antinormalserum und Antimyelomseren zeigen einen deutlichen Unterschied in den immunologischen Proteineigenschaften der Eiweißkörper vom Typ der Makroglobulinämie WALDENSTROM einerseits und den verschiedenen Myelomproteinen andererseits.

Somit kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen das Myelomprotein folgendermaßen charakterisiert werden. Es handelt sich um zumeist quantitativ stark angereicherte Eiweißkörper mit zwar unterschiedlicher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit, aber gleichartiger d. h. gemeinsamer Grundstruktur. Es bestehen enge Beziehungen zu den entsprechenden physiologischen Proteinen, sie unterscheiden sich jedoch von diesen funktionell, worin wohl der atypische Charakter am ehesten zu sehen ist.

An der Herkunft dieser atypischen Proteine besteht heute kein Zweifel mehr. Es ist nur noch nicht restlos geklärt, inwieweit die verschiedenen elektrophoretisch und immunologisch differenzierbaren Proteintypen verschiedenen Funktionsphasen der Myelomzelle zuzuordnen sind oder vielleicht verschiedenen Reife- bzw. Entwicklungsgraden entstammen.

Zusammenfassung

Zur Charakterisierung von Myelomproteinen gegenüber Makroglobulinen und Normalproteinen wurden verschiedene papier- und agar-elektrophoretische, Färbetechniken sowie Fermentnachweismethoden angewandt. Myelomproteine besitzen im wesentlichen Glykoproteinnatur. Hinsichtlich der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und Differenzierbarkeit von Myelomproteinen bestehen erhebliche Unterschiede in den Befunden der Agar- und der Papierelektrophorese. Die atypischen Proteine weisen keine Aktivität von Oxydase, Amylase und alkalischer Phosphatase auf. In immunologischer Hinsicht bestehen enge Beziehungen zu den entsprechenden physiologischen Proteinen. Myelomproteine unterscheiden sich aber von physiologischen Proteinen durch fehlende funktionelle Eigenschaften. Myelomproteine sind immunologisch von Makroglobulinen präzise abgrenzbar, obwohl sie in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (als Glykoproteine) weitgehend mit diesen überschneiden.

Summary

Various paper and agar electrophoretic staining techniques and enzyme determination methods were used to distinguish between myeloma proteins on the one hand and macroglobulin and normal proteins on the other. Myeloma proteins are essentially similar to glycoproteins. There are considerable differences in the results of agar- and paper electrophoresis in relation to the rate of migration and differentiation of myeloma proteins. The atypical protein shows no oxydase, amylase and alkalin phosphatase activity. Immunologically there is a close relationship to the appropriate physiological protein. Myeloma protein is distinguished from physiological protein by the absence of functional characteristics. Myeloma protein can be clearly differentiated from macroglobulin immunologically although (as a glycoprotein) it is largely identical with the latter in its physicochemical properties.

Résumé

Pour différencier les protéines du myélome des macroglobulines, nous avons employé l'électrophorèse sur papier et sur agar ainsi que différentes méthodes fermentaires et de coloration. Les protéines du myélome sont essentiellement de nature glycoprotéique. Les études à l'aide de l'électrophorèse sur papier et sur agar donnent des résultats très différents sur la vitesse de migration des protéines du myélome et sur les possibilités de différenciation. Les protéines atypiques n'ont pas d'activité d'oxydase, d'amylase ni de phosphatase alcaline. Du point de vue immunologique, il existe des relations étroites avec les protéines normales. Les protéines du myélome diffèrent des protéines normales par le manque de certaines propriétés fonctionnelles. Les protéines du myélome peuvent être différenciées de façon précise des macroglobulines par des méthodes immunologiques quoique leurs propriétés physico-chimiques (en tant que glycoprotéines) correspondent largement.

Literatur

1. BALLINCK, R. E., JAMES, J. W. AND NEHRAU, G. H. Identification of so-called atypical macroglobulinemia as an atypical form of β_2 -microglobulinemia. *see immunological survey* Nature, London 189: 768-770 (1961).
2. BRIDA, H. L. UND GASPAR, E. Das Proteingramm auf Papier und auf Agar (1) ergiebende Untersuchung einiger Diagramme im Falle von Myelom). *Ges. med. port.* 1/1: 604-608 (1960).
3. BERTZ, D., TROVATTO, TH. ET BERTZ, P. Étude quantitative de la β_2 -globuline dans les sérums de myélome. *Rev. franç. Ét. chim. biol.* 7: 292-293 (1962).

4. CARMONA, A. O.; MARINO, G. AND LORTE, R.: Studies on normal and pathological γ , μ -globulins and their subunits. *Prot. Biol. Fluids*. 11th. Coll., p. 45 (Verlag Elsevier Publ. Comp., Amsterdam/London/New York/Princeton 1963)
5. CIELA, E., SALTERI, F., COLONNO, B.: Osservazioni sulle caratteristiche del carboidrato serici in pazienti con mieloma con sindrome di WALDENSTROM. *Haematol.*, Milano 4: 303-311 (1960).
6. GRENZLY J.; JAKOB, L.; MITUSOVA, L., SEIMAY G. UND ZULIK, R.: Untersuchungen mit β -Myelomschweifkörpern, mit bes. Rücksicht auf deren Antigeneigenschaften. *Z. ges. inn. Med.* 15: 946-952 (1960).
7. GÖTZ, H., BERG, H. UND SCHREFFARTS, F.: Methodische Grundlagen der Immunelektrophorese. *Z. Immun. Forsch.* 114: 72 (1957).
8. GÖTZ, H. UND SCHREFFARTS, F.: Über die Änderung der Serum-Unterfraktionen, insbesondere der β -Immunkomponenten, im Verlaufe der Myelomkrankheit. *Acta haemat.* 25: 361-367 (1961).
9. GÖTZ, H.; SCHREFFARTS, F. UND HOFFMANN D.: Diastomenschwefel in einigen menschlichen Organextrakten mit Hilfe der Elektrophorese im Agarose. *Z. Gastroent.* 2: 76-78 (1964).
10. GRABAR, P.: Anticorps et «Globulines-Transporteurs». *Prot. Biol. Fluids*. Proc. 11th Coll. Bruges 1963 (Verlag Elsevier Publ. Comp., Amsterdam/London/New York/Princeton).
11. GRABAR, P., FAUVERT R.; BERTIN, P.; HARTMANN, L.; COUDRONS, J., CAVELLOS, J. et BOCCALIERO, M.: Étude sur les protéines du myélome. II. L'analyse immunoelectrophorétique des sérums de 30 malades. *Rev. franç. Et. chim. biol.* 1: 175-186 (1956).
12. GRABAR, P. ET WILLIAMS, G. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. biophys. Acta* 10: 193 (1953). Méthode immunoelectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. biophys. Acta* 17: 67 (1955).
13. GRASSMANN, W. UND HANSEN, K.: Über ein Verfahren zur Stofftrennung durch Kathaphorese. *Angew. Chemie* 62: 170 (1950).
14. HANSEN, K.: Papierelektrophorese in der Eiweißchemie. In HORRE-SAYLER's und THOMASSEN's Handbuch der physiol. und path. chem. Analyse, 8. Aufl. IV/1 (1960).
15. HENNING, N.: Klinische Laboratoriumsdiagnostik (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1960).
16. HENNING, J. F.: Les globulines du sérum humain. Leur nature et leur valeur pathologique (Masson, Paris 1961).
17. HENNING, J. F.; HENNING, M. TH.; LAURELL, A. H. F.; LAURELL, C. B., WALDENSTROM, J.; MARTINSON, L. AND SJÖGREN, J.: Studies on «abnormal» serum globulins (M-components) in myeloma, macroglobulinemia and related diseases. *Acta med. scand.* 170: Suppl. 367: 7-126 (1961).
18. HILL, R. M.; MULLIGAN, R. M. AND DUNLOP, S. G.: Plasma cell myeloma associated with high concentrations of plasma lipoproteins. *Amer. J. Path.* 24: 589 (1948).
19. ISHIMORI, K. AND MORSE, M.: Globulins and myeloma: the structural characterization of γ -globulin and myeloma protein. *Arch. Biochem.* 97: 236-242 (1962).
20. KRADEL, M.: Die proteingebundenen Kohlenhydrate in isolierten Eiweißfraktionen bei Hypergammaglobulinämie und Paraproteinämien. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 66: 694 (1961).
21. KORNWOLD, L. AND LIPARI, R.: Multiple-myeloma proteins. I. Immunological studies. *Cancer* 9: 185-192 (1956).
22. KLOTZ, R. A. UND HANSEN, A.: Qualitative und quantitative Untersuchungen des Serum-Plasmyelomkranker. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 66: 134-137 (1959).

Beitrag zum Verhalten der Lip- und Glykoproteide beim Plasmozytom. *Klin. Wochschr.* 30: 908-911 (1958).

21. LACEY, C. R., LAURELL, H. and WALDENSTRÖM, F.: Glycoproteins in serum from patients with myeloma, macroglobulinemia and related conditions. *Amer. J. Med.* 22: 4-36 (1957).
22. LEVINSKY-JONES, J. E.: Myelomatosis with hyperemia and xanthomas. *Brit. med. J.* 1: 781-783 (1960).
23. LEVOW, H., SCHNEIFELD, M. R., MINSKOFF, Ch. R. and OST, T.: Nonprotein causes of acid hyperphosphatemia. Report of a case due to multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 242: 991-993 (1967).
24. MAJONE, R. and SCARFONE, L.: Carbohydrate content of anomalous seroglobulin and Bence Jones protein in myeloma. A comparative study. *Clin. chim. Acta* 6: 403-406 (1961).
25. MARKE, M. and KUTZEL, H. G.: Classification of myeloma proteins, Bence Jones proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters. *J. exp. Med.* 116: 839-847 (1962).
26. MARTIN, E. and SCHNEIDER, J. J.: Myelomatose diffuse et immunoelectrophorèse. *Schweiz. med. Wochschr.* 87: 439-442 (1957).
27. MARTIN, E. H. and SCHNEIDER, H.: The non-protein constituents of the plasma in myelomatosis. *J. clin. Path.* 11: 330-333 (1958).
28. MCCOWELL, R. J. and MARTIN, E. H.: The myeloma globulins. *Brit. J. Cancer* 12: 254-274 (1958).
29. McFARLANE, A. S.: Serum protein changes in multiple myelomatosis. *Clin. Radiol.* 12: 29-30 (1961).
30. MORTON, J. L. and DETTICH, H. F.: Some immunochemical relations of Bence Jones and hyperglobulinemic serum proteins of multiple myeloma patients. *Cancer Res.* 18: 1221-1224 (1958).
31. NIELSEN, E. A. and PEROLA, R.: Serum protein-bound carbohydrate pattern in normal subjects and in patients with multiple myeloma. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12: 209-220 (1960).
32. OBERMANN, E. F. and LAWSON, D.: Immunoelectrophoretic characterization of the serum and urinary proteins in plasma cell myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94: 93-109 (1961).
33. OCHTERLOFF, O.: Antigen-antibody reactions in gels. *Art. Kemi, Mfa. Cool.* 15: 1 (1949).
34. PAGGI, G.: Le glicoproteine del siero nelle affezioni maligne. *Folia endocrin.* 12: 704-714 (1960).
35. RICH, W. G. and YAMADA, M.: The occurrence of a PAS-positive protein fraction in paper electrophoresis of serum in myelomatosis. *J. Lab. clin. Med.* 44: 544 (1954).
36. RIVA, G.: Das Serumweißbild, p. 345 (Hans Huber Bern/Stuttgart 1957).
37. ROULET D. L. A., SPINOLER, G. A. and HANCO, A.: Immunoelectrophoretische Untersuchungen an Paraproteinen. *Cancro (Torino)* 14: 600-620 (1961).
38. ROULET D. L. A., SPINOLER, G. A., GUTHER, E., RUDOLPH, C.; RIVA, G. and HANCO, A.: Antigenanalytische Untersuchungen an Paraproteinen. *Helv. med. Acta* 28: 1: 28, 177-183 (1961).
39. SACHS, M. D., BERNARD, G. A., CARY, P. and ROSE, G.: An abnormal lipid-like material and carbohydrate in the sera of patients with multiple myeloma. *Amer. J. Med.* 17: 66-69 (1954).
40. SCHIFFART, F., BERG, G. and GÖTT, H.: Papierelektrophorese in Klinik und Praxis (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1962).
41. SCHIFFART, F. and GÖTT, H.: Eine Methode zum Diamnachweis antigenischer getrennter Proteingemische. *Klin. Wochschr.* 42: 130-131 (1964).

44. SCHREYARTS, F.; GÖTZE, H. UND CZAMANY, F. Zur quantitativen Bestimmung der Cereuloplasminkonzentration im Serum (Unter bes. Berücksichtigung von Leberparenchymerkrankungen und malignen Prozessen) *Med. Welt* 28: 1449-1453 (1961).
45. SCHREYARTS, F., GÖTZE, H. UND KNOPFF, H. Die Bedeutung kombinierter Färbef verfahren nach Immunoelektrophoretischer Analyse pathologischer Seren. *Acta haemat.* 26: 169-181 (1961).
46. SCHREYARTS, F.; GÖTZE, H. UND SCHRODL, K. Immunoelktrophoretische Studien an Myelomseren. *Klin. Wochs.* 36: 82-86 (1958).
47. SCHREYARTS, F., GÖTZE, H. UND VARMATE, H. Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Serum mit Hilfe der Agar-Elektrophorese. *Med. Welt*: 2216-2220 (1962).
48. DA SILVA, A. B.; DA COSTA, S. F. UND DA SILVA, J. A. F. Versuche mit einem Immuno-Serum spezifischen Anti-Serums in einem Fall von Myelom. Isolierung eines normalen und spezifischen Proteins (Vorl. Mitteilung) *Gaz. méd. port.* 13: 597-603 (1960).
49. SPINOLER, G. A.; ROULLET, D. L. A.; BUTLER, R.; HANCO, A. UND RIVA, G. Zur Antigensanalyse von Paraproteinen. *Schweiz. med. Wochs.* 90: 1262-1264 (1960).
50. URTEL, J. Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gelose. *Bull. Soc. Chim. biol.* 39 Suppl. 1: 105 (1957).
51. URTEL, J., GÖTZE, H. UND GRABAR, P. Etude de la céruloplasmine du sérum humain par l'électrophorèse en gelose et l'analyse immuno-électrophorétique. Microdétec tion colorimétrique du cuivre (86) aux protéines. *Schweiz. med. Wochs.* 47: 431 (1957).
52. URTEL, J. ET GRABAR, P. Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieux gélifiés. *Ann. Inst. Pasteur* 90: 629 (1956).
53. URTEL, J.; GRABAR, P. ET WUNDERLY, Ch. Etude d'un sérum de macroglobulinémie par l'électrophorèse en gelose et sur papier et par ultracentrifugation. *Clin. chim. Acta* 2: 33 (1957).
54. URTEL, J. ET SCHNEIDER, J. J. Electrophorèse en gelose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. biol.* 37: 163 (1955).
55. WALDENSTRÖM, J. Abnormal Proteins in Myeloma. *Adv. Intern. Med.* 5: 390 (1952).
56. WENZEL, H. Der Nachweis von acetonemulischen Lipoproteinen im Plasmoerythrocytweiß und Bence Jones Eiweißkörper. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 203: 79-81 (1956).
57. WUNDERLY, St. UND SCHNEIDER, G. Plasmoerythrom mit atypischer Makroglobulinämie. Beitrag zur Frage der nosologischen Stellung der sogenannten atypischen Makroglobulinämie. *Medicine, Balt.* 205: 213-230 (1956).
58. WUNDERMANN, F. UND WUNDERLY, Ch. Die Blutweißkörper des Menschen. Untersuchungsverfahren und deren klinisch-praktische Bedeutung (Bosch Schwabe, Basel 1953).
59. WUNDERLY, Ch. UND PILLER, S. Die Färbung der im Erythrocyten enthaltenen Proteine, Lipide und Kohlenhydrate nach Fajdenchuk. *Klin. Wochs.* 32: 425 (1954).
60. YACHI, A.; FUKUDA, M. UND ANZAI, T. A case of multiple myeloma with reference to immunoelectrophoretic analysis of myeloma protein. *Supp. mod. J.* 16: 411-424 (1959).

Ans der Abteilung für klinische Immunpathologie der Medizinischen Universitätsklinik,
Freiburg im Breisgau

Untersuchungen über kältelabile und wasserlabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien

Von H. SCHUBOTHE, S. RAJU und D. KLEMM

Seit den Mitteilungen von WENTROBE UND BUELL (9) v. BOYSDORF *et al* (1) WALDENSTRÖM (8) sowie LERNER UND WATSON (3) sind bei Patienten mit Paraproteinämien und Dysproteinämien (4) oft kältelabile Serumkomponenten beobachtet und beschrieben worden. LERNER UND WATSON haben sie unter dem Terminus «Kryoglobulines» zusammengefaßt. Grundsätzlich können solche Serumkomponenten bei niedriger Temperatur zu drei verschiedenen wärmerereversiblen Phänomenen führen: (1) Kältepräzipitation und/oder (2) Kältegefällung und/oder (3) abnorme Kälteviskositätssteigerung (vgl. 6). Seren, die bei Abkühlung eine erhöhte Viskositätszuwachsrate zeigen, sind meist auch schon bei 37 °C visköser als normale. Reihenuntersuchungen über die Häufigkeit und den Intensitätsgrad von Kälteabilitätsphänomenen in dysproteinämischen und paraproteinämischen Seren sind unseres Wissens bisher noch nicht durchgeführt worden. Das gilt auch für das Trübungsphänomen («Euglobulintest»), das nach Eintropfen von Seren in destilliertes Wasser zu beobachten ist (8). Wir möchten im folgenden über die Resultate solcher Reihenuntersuchungen berichten.

Auch der mikroskopischen Beschaffenheit kältelabiler und wasserlabiler Proteine ist bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Nach einer vorläufigen Mitteilung über das phasenkontrastmikroskopische Bild kältepräzipitierender Serumkomponenten (7) möchten wir hier weitere phasenoptische Befunde mitteilen, die außer an kältepräzipitierenden, auch an kältegefällenden und abnorm viskösen Seren sowie an wasserlabilen Proteinen erhoben wurden.

Untersuchungsgut und Methodik

Die Reibensuntersuchungen wurden durchgeführt an 50 Seren gesunder Personen im Alter von 20 bis 28 Jahren (33 Männer und 17 Frauen). 50 Seren von Patienten mit Dysproteinaemien (35 chronische Leberkrankheiten, 11 chronische entzündliche Erkrankungen, 4 maligne Tumoren) bei denen eine starke Beschleunigung der Blutkörperchen-senkungsgeschwindigkeit und ausgeprägte Veränderungen im Papierphorogramm (Globulinvermehrungen mit breitbasigen Gradienten) jedoch keine Hinweise für eine Paraproteinaemie bestanden und 58 Seren von Patienten mit Paraproteinaemien (25 Plasmacytose, 18 Makroglobulinaemien, 8 chronische Kälteagglutininkrankheiten, 7 atypische paraproteinaemische Hämoblastosen).

Bei der Gewinnung der Seren wurde eine Abkühlung unter Körpertemperatur sorgfältig vermieden. Sofort nach der Präparation wurden mehrere Proben des Serums in Wasserbäder verschiedener Temperaturen verbracht und nach 2 bzw. 24 Stunden auf eine etwaige Trübung und/oder Gellierung beurteilt sowie ihre Viskosität innerhalb von 2 Stunden nach dem Kugelfällprinzip gemessen (Technische Einzelheiten s. 6). Die 58 Paraproteinaemien umfassen 16 Fälle aus den Jahren 1962 und 1963 bei denen noch keine 2-Stundenwerte sondern nur 24-Stundenwerte für die Beurteilung auf Kältepräzipitation und -gellierung erhoben worden waren.

Für die Prüfung auf wasserlabile Proteine (Englobulintest) benutzten wir eine große Kävete aus Kristallglas (6×6×25 cm) die vor einem geschweiften Hohlraum zur Gewährleistung eines absolut dunklen Hintergrundes gestellt und von beiden Seiten indirekt beleuchtet wurde. Die Kävete wurde mit destilliertem Wasser gefüllt. Von dem zu untersuchenden Serum wurden 1 bis 2 Tropfen mit einer Pasteurpipette eingebracht und während des Abkühlens auf ihren Trübungsgrad durch semiquantitative Schätzung, ([+] bis +++) beurteilt.

Phasenoptisch wurden auf kältelabile Komponenten insgesamt 17 dysproteinaemische Seren untersucht. Nachdem ein Phasenkontrastmikroskop in einem Kühlraum von +4 °C vortemperiert worden war wurde zunächst bei Zimmertemperatur von ca. 20 °C ein Tropfen Serum auf einen Objektträger verbracht, mit Deckglas und Paraffin-schmelze versehen, darauf im Kühlraum mikroskopisch sofort und nach verschiedenen langen Zeiten (bis 24 Stunden) beobachtet, resp. fotografiert (vgl. 7).

Wasserlabile Proteine wurden für die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung so präpariert, daß nach Eintröpfen von dysproteinaemischen oder paraproteinaemischen Seren in destilliertes Wasser die entstehende Trübung zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes auf einem Objektträger gebracht, mit Deckglas versehen und bei Zimmertemperatur mikroskopisch betrachtet und fotografiert wurde.

Ergebnisse

I Die *Häufigkeit und der Intensitätsgrad der Labilitätsphänomene* in den untersuchten Seren sind in den Abbildungen 1 bis 3 und 5 graphisch registriert. Um eine übersichtliche Darstellung zu erhalten, haben wir hier die drei untersuchten Serumkollektive summarisch ausgewertet ohne Berücksichtigung der individuellen Krankheitsbilder.

A. Kältepräzipitation

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß in den von uns untersuchten *normalen Seren* weder nach 2 Stunden noch 24 Stunden im

	Normale Personen	Dysprotein- ämien	Paraprotein- ämien
++++ -			
+++			
2 Std. ++			
(+)			
++++ -			
+++			
24 Std. ++			
(+)			

Abb. 1 Häufigkeit und Stärkegrad von Kältepräzipitationen in 50 dysproteinämischen und 58 paraproteinämischen Seren verglichen mit 50 normalen Kontrollseren nach 2- bzw. 24stündigem Verbleib der Seren im Eiswasserbad (2-Stundenwerte bei Paraproteinämien nicht registriert).

Eiswasserbad eine Kältepräzipitation zu beobachten war. Von den *dysproteinämischen Seren* zeigten 12 nach 2 Stunden, 24 weitere (also insgesamt 36) nach 24 Stunden eine mehr oder minder starke Trübung, die sich beim Zentrifugieren im Eismantel nach unten absetzte und im Wasserbad von 40 °C kurzfristig wärmererüberbel war. Die Intensität der Trübung war in den nach 2 Stunden bereits präzipitierenden Serumproben nach 24 Stunden deutlich stärker geworden. Die Frequenz positiver Resultate ist überraschend hoch, was unseres Wissens bei Dysproteinämien bisher noch nicht beschrieben worden ist. Von den *paraproteinämischen Seren* sind in Abb. 1 lediglich die 24-Stundenwerte registriert, weil die 2-Stundenwerte nur von 42 Seren vorliegen, darunter 13 mit eindeutiger Trübung, die in 3 Fällen bereits nach wenigen Sekunden begann (vgl. 5). Die 24-Stundenwerte lassen in 37 der 58 Seren eine positive Kältepräzipitationsreaktion erkennen, die nur in 3 Fällen einen wesentlich stärkeren Grad als bei den untersuchten dysproteinämischen Seren erreichte.

Zusammenfassend sprechen die Befunde dafür, daß eine Kältepräzipitation in normalen Seren nicht vorzukommen scheint, bei Erkrankungen mit pathologischem Eiweißbild aber ein sehr häufig-

	Normale Personen	Dysprotein- ämien	Paraprotein- ämien
++++ -			----
+++			
++			
+			
(+)			

Abb. 2. Häufigkeit und Stärkegrad von Kältegefälsungen in 36 paraproteinämischen Seren nach 2 bzw. 24stündigem Verbleib des Seren im Ekwasserbad. Fehlen des Phänomens in 50 dysproteinämischen und 50 normalen Seren.

ges Phänomen ist und nicht nur bei Paraproteinämien (in rund zwei Dritteln der untersuchten Fälle) sondern auch bei Dysproteinämien (in rund drei Vierteln der untersuchten Fälle) nachweisbar ist.

B Kältegefälsungen

Abb. 2 zeigt, daß in keinem der untersuchten normalen und dysproteinämischen Seren nach 2 oder 24 Stunden im Ekwasserbad eine Gefälsung zu beobachten war. Dieses Phänomen blieb auf die Paraproteinämien beschränkt. Hier trat es in 6 Fällen in verschieden starkem Grade ein und begann bereits eine oder wenige Minuten nach der Abkühlung. Das Maximum war nach 15 bis 120 Minuten erreicht, so daß die in Abb. 2 registrierten 2-Stundenwerte von den 24-Stundenwerten nicht differieren. Bemerkenswert ist, daß in manchen Seren, die 2 Tage oder länger im Kühlschrank bei ca. + 5 °C gestanden hatten, die Kältegefälsung nicht mehr reproduzierbar war was für eine Inaktivierung des Phänomens durch Alterung des Serums spricht.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Kältegefälsung ein ziemlich seltenes Phänomen ist, das weder in Seren normaler Menschen noch, soweit bisher bekannt, bei Dysproteinämien vorkommen scheint. Bei Paraproteinämien findet es sich in unserem Beobachtungsgut in etwa einem Zehntel der Fälle (4 Plasmozytome 2 Makroglobulinämien).

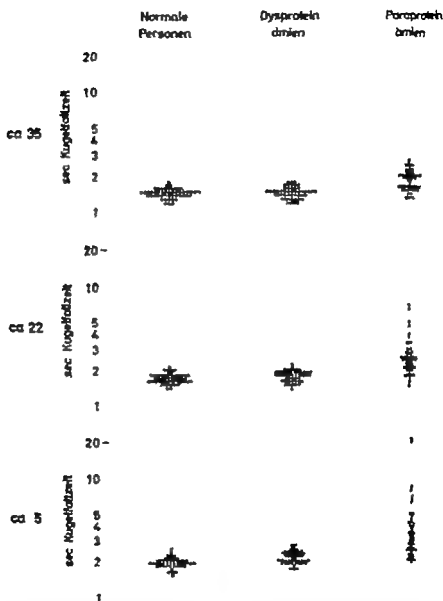


Abb. 3. Häufigkeit und Stärkegrad abnormer Viskositätssteigerung in 52 paraproteinämischen Seren verglichen mit 50 normalen und 50 dysproteinämischen Kontrollseren (6 kälteglättigende Paraproteinseren sind hier nicht mitregistriert).

C. Abnorme Viskositätssteigerung

Die Viskositätswerte (angegeben in Sekunden Kugelfallzeit bei ca. 35 °, ca. 22° und ca. 5 °) der drei untersuchten Serumkollektive sind aus Abb. 3 zu entnehmen. Die *Normalseren* zeigten auf allen drei untersuchten Temperaturstufen Streuungen von annähernd statistischer Verteilung mit Mittelwerten von 1,46 sec (35 °), 1,7 sec (22°) und 2,05 sec (5 °). Die Viskosität der *dysproteinämischen Seren* weicht von der Norm wenig ab. Die obere physiologische Grenze wird bei 35 ° nicht, bei 22 ° in 1 Fall, bei 5 ° in 3 Fällen wenig überschritten. Die Mittelwerte betragen bei 35 ° 1,48 sec, bei 22 ° 1,77 sec, bei 5 ° 2,25 sec. Von diesem weicht nur der letztere signifikant von dem entsprechenden Normalwert ab (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1 /). Hier deutet sich also eine (allerdings minimale) Viskositätszunahme bei Temperaturerniedrigung an. Von den *paraproteinämischen Seren* wurden 6 in die Abbildung 3 nicht mit aufgenommen, weil sie in der Kälte gelierten und eine verlängerte Kugelfallzeit oberhalb 5 ° bei ihnen vermutlich durch beginnende Gelbildung bedingt war nicht durch die der reinen Viskositätsvermehrung zugrunde liegende molekulare Modifikation. Die Einzelwerte dieser Seren lagen auf der 35 °-Stufe zwischen 4,5 und 13 sec, auf der 22 °-Stufe zwischen 4,4 und 21,3 sec, auf der 5 °-Stufe zwischen 4,2 und 20 sec (in einem Fall bei unendlich). Das Kollektiv der restlichen 52 Seren zeigt im Gegensatz zu den dysproteinämischen ein ausgeprägt pathologisches Befundsmosaik. In 30 Fällen wird bereits auf der 35 °-Stufe die obere Grenze der normalen Viskositätsspielbreite überschritten. Diese Zahl erhöht sich bei 22 ° auf 33, bei 5 ° auf 35. Nur die Werte von 17 Seren, also etwa einem Drittel der Fälle, liegen ganz innerhalb der Normalbreite. Die pathologischen Seren haben ferner einen gegenüber der Norm erhöhten Viskositätszuwachs mit fallender Temperatur.

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß in den untersuchten dysproteinämischen Seren die normale Viskositätsspielbreite nur in vereinzelten Fällen um sehr geringe Werte überschritten wird und sich aus den Mittelwerten nur eine minimale Viskositätszunahme bei Abkühlung auf 5 ° C ergibt. Von den paraproteinämischen Seren verhalten sich rund zwei Drittel pathologisch, wobei die Viskositätswerte auf den einzelnen Temperaturstufen verschieden stark, zum Teil extrem stark erhöht sind, und die Viskositäts-

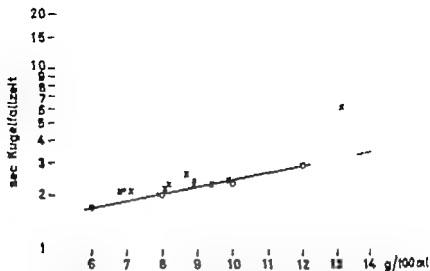


Abb. 4. Relation zwischen Serumviskosität (22 °C) und Serumgesamtweiß bei 23 Fällen von Paraproteiämie mit Serumviskositätsüberhöhung. Schwarze Punkte: Makroglobulinämien Waldenström, Kreuze: Plasmocytome, Kreise: Hemagglutinoglobulinlösungen verschiedener Konzentrationen.

	Normale Personen	Dysprotein- ämien	Paraprotein- ämien
++++ -			1
+++			1
++ -		1	1
+	1	1	1
(+)-	1	1	1
	1	1	1

Abb. 5. Häufigkeit und Stärkegrad einer Erythrozyten-Trübungreaktion in je 50 normalen, dysproteinämischen und paraproteinämischen Seren.

zunahme mit fallender Temperatur wesentlich größer als bei normalen Seren ist.

Besonders betont werden muß, daß die pathologischen Viskositätswerte der paraproteinämischen Seren keine Proportionalität zu den jeweiligen Serumgesamtweißwerten aufweisen. Dies ist aus

Abb. 4 zu entnehmen, in der wir die 22 Viskositätswerte einer normalen Humanglobulinlösung von 6, 8, 10, 12 und 14 g / Konzentration eingezeichnet haben. Die Punkte liegen in der logarithmischen Skala auf einer Geraden, die mit zunehmender Konzentration ansteigt. Als Einzelpunkte sind in der Abbildung alle pathologischen 22 Viskositätswerte paraproteinämischer Seren in Beziehung zu ihrem Gesamteiweißwert registriert. Das Fehlen einer Korrelation zwischen abnormer Viskosität und Serumweißwert ist ebenso deutlich, wie die individuell verschieden starke pathologische Viskositätssteigerung. Diese muß also durch ein qualitativ abnormes Verhalten der Paraproteinfraktion bedingt sein.

D. Euglobulintest

Ergänzend stellen wir den obigen Befunden die Ergebnisse des Euglobulintestes an den drei Serumkollektiven gegenüber. Sie sind in Abb. 5 aufgezeichnet. In der *Normalgruppe* finden sich 11 schwach positive Reaktionen. Bei den *dysproteinämischen Seren* sind positive Reaktionen verschieden starken Grades relativ am häufigsten. Nur in 12 Fällen, also etwa einem Viertel der Fälle, fiel der Test negativ aus. Bei den *Paraproteinämien* ist etwas über die Hälfte (30) der Fälle positiv, doch ist hier die Frequenz der quantitativ stärksten Reaktionen am größten. Unter Berücksichtigung der Normalserumbeispiele können bei diesem Test nur stärkere Trübungen als eindeutig pathologisch bewertet werden.

E. Kombination mehrerer Kälteabwirtsphänomene

Nicht selten findet sich in einem und demselben Serum eine Kombination mehrerer Kälteabwirtsphänomene. Bei Dysproteinämien scheint die Kombination Kältepräzipitation plus minimale abnorme Kälteviskositätssteigerung öfter vorzukommen. Da die letztere jedoch nur im Mittelwert des Kollektivs erkennbar wird, ist eine individuelle zahlenmäßige Erfassung der Kombination nicht möglich.

Von den 58 untersuchten paraproteinämischen Seren zeigten 27 gleichzeitig mehrere Kälteabwirtsphänomene, und zwar 5 die Kombination Kältepräzipitation plus Kältegefällung, 22 die Kombination Kältepräzipitation plus abnorme Kälteviskositätssteigerung. Auf die Annahme einer Kombination von Kältegefällung

kation plus abnorme Kälteviskositätssteigerung muß wegen der Unmöglichkeit einer methodischen Differenzierung vernachlässigt werden.

II Die qualitativen *phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen* ergaben die folgenden Resultate

A. Die *Kältepräzipitation* wurde an 20 dysproteinämischen und 10 paraproteinämischen Seren studiert, die bei der Abkühlung im Eiswasserbad nach kurzer Zeit oder innerhalb 24 Stunden verschälen den starke, abzentrifugierbare, wärmerereversible Trübungen ergeben hatten. Vorläufige Resultate sind schon an anderer Stelle mitgeteilt worden (7). Mikroskopisch sah man in den Objektträgerpräparaten dieser Seren nach Abkühlung auf $+4^{\circ}\text{C}$ teilweise schon innerhalb weniger Minuten, teilweise innerhalb einiger Stunden, zahlreiche winzige amorphe Pünktchen und/oder kleine Tröpfchen auftreten. Die Tröpfchen zeigten eine Tendenz, zu größeren Tropfen zusammenzufließen. Die winzigen Pünktchen pflegten zu kleinen korallenstockartigen Bezirken zu aggregieren. An diesen zunächst unregelmäßigen kleinen Bezirken war nach längerem Verbleib der Präparate in einer Umgebungstemperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ nach 4, 24 oder 72 Stunden zum Teil ebenfalls ein Konfluieren der winzigen Partikel zu beobachten, wobei entweder kleine homogene Tropfen entstanden, ähnlich den eben beschriebenen, oder abgerundete partiell homogenisierte Gebilde, die jedoch noch eine angedeutete feine Granulierung erkennen ließen. Bei einem Teil der Seren wurde eine eindeutige Homogenisierung der zahlreichen winzigen Partikel vermißt, wobei sich nicht sicher entscheiden ließ, ob in diesen Fällen die relativ geringe Quantität der Partikel eine unzureichende Voraussetzung für eine Homogenisierung war oder ob ihnen überhaupt die Fähigkeit zum Konfluieren fehlte.

Wie wir schon früher diskutiert haben (6) scheint es verschiedene Typen der Entmischung kälte labiler Serumkomponenten zu geben. Einer dieser Typen besteht in einer unmittelbaren tropfungsartigen Entmischung ein anderer in einer zunächst feinstkörnigen Entmischung mit Tendenz zum Konfluieren im Laufe mehrerer Stunden. Ob die Fälle mit nicht eindeutigen Konfluieren der winzigen Partikel einen dritten «amorph-soliden» Entmischungstyp darstellen, muß offen bleiben. Kein Zweifel kann daran bestehen, daß bei dem erstgenannten Typ sich die kälteunlösliche Serumfraktion primär in flüssiger Form abscheidet. Er lag eindeutig bei 6



Abb. 6. Phasenkontrastmikroskopische Bilder einer paraproteinämischen Kalbeprecipitation: a) Typ der primär flüssigen Entmischung. b) Spätstadium ca. 30 Minuten nach Abkühlung. Konfluieren der Tropfchen zu größeren und großen Tropfen. Serum eines P. leucae mit chronischer Kalbserumkrankheit. Ca. 920

unserer Fälle vor. Die Homogenisierung bei dem zweiten der geschilderten Typen spricht ebenfalls für einen flüssigen Aggregatzustand des in Kalte ausfallenden Serumanteils. Diese Variante haben wir in 6 verschiedenen Seren beobachtet. Nach wiederholten Kontrollen und Reproduktionen der Versuche mochten wir jedoch in Erweiterung unserer früheren Mitteilung die Möglichkeit eines feinstkornig-soliden Entmischungstyps *ohne* eindeutige Tendenz zum Konfluieren (12 Fälle) nicht ausschließen. Doch konnte in diesen Fällen auch die relative Spärlichkeit der präzipitierten Partikel Grund für ihre mangelhafte oder fehlende Homogenisierung sein. Kristalloide Ausfällungen wie sie v. BOYNDORF *et al.* (1) sowie HOLMÄRZ UND GROTHWALL (2) beschrieben, haben wir an unserem Beobachtungsgut nicht gesehen. Abb. 6 zeigt ein Beispiel für den primär flüssigen Entmischungstyp. Abb. 7 zeigt ein Beispiel für die feinstkornige Entmischung mit sekundärer Homogenisierung.

Alle beschriebenen Varianten waren sowohl an den unter suchten dysproteinämischen wie auch an den paraproteinämischen

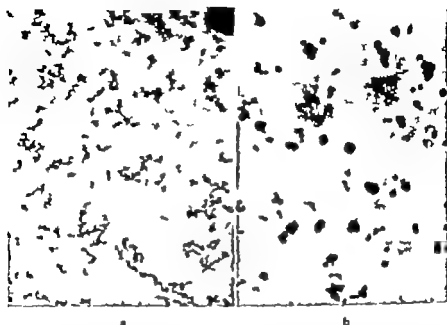
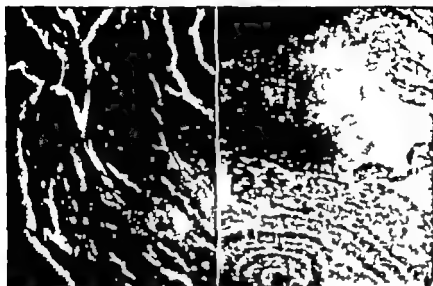


Abb. 7 Phasenkontrastmikroskopische Bilder einer paraproteinemischen Latexpräparation vom Typ der primär feinkörnigen Entmischung mit sekundärer Homogenisierung. a) Frühstadium ca. 10 Minuten nach Abkühlung des Serums. Korallenrockartige Aggregate der entmischten Partikel. b) Spätestadium ca. 48 Stunden nach Abkühlung. Konfluieren der Aggregate zu homogenen tropfenartigen Bezirken. Serum einer Patientin mit Makroglobulinämie. Ca. 320

Seren zu beobachten, an den letzteren jedoch mehrere Male quantitativ viel stärker ausgeprägt. Nach Erwärmen auf ca. 37 °C war auch mikroskopisch eine vollständige Auflösung der entmischten Fraktionen im umgebenden Serum zu beobachten. Zwischen der Grundkrankheit und dem jeweiligen Entmischungstyp ergeben sich aus unserem bisherigen Beobachtungsgut keine eindeutigen Korrelationen.

II Phasenmikroskopische Untersuchungen der *Fällgefäßstruktur* konnten wir bisher an 3 paraproteinemischen Seren durchführen. Hier blieb, nachdem die Geltransformation zwischen Objektträger und Deckglas eingetreten war, das Gesichtsfeld zunächst homogen. Etwaige Strukturen waren phasenoptisch nicht faßbar. Im Laufe von ca. 30 Minuten bis zu mehreren Stunden traten bei konstant niedriger Temperatur jedoch spontan rundliche Lucken, Risse, Spalten und Brüche in der Gelmasse auf, die freie Flüssigkeit enthielten (Abb. 8a). Ähnliche Veränderungen ließen sich auch kurz



b

Abb. 2. Phasekontrastmikroskopische Bilder eines paraproteinämischen Kältegels. a) ca. 4 Stunden nach Abkühlung durch spontane Retraktion der homogenen Gelmasse entstandene Brüche und Spalten. b) ca. 5 Minuten nach Abkühlung durch Druck auf das Deckglas künstlich erzeugte Zertrümmerung der homogenen Gelmasse. Serum einer Patientin mit Makroglobulinämie. Ca. 320

nach Eintritt der Kältegelbildung künstlich durch Druck auf das Deckglas erzeugen (Abb. 8b). Die Gelmasse ist nach einer gewissen Alterung oder nach mechanischer Läsion also offensichtlich zu einer Retraktion fähig, bei der ein anfangs nur passiv mit eingeschlossener flüssig gebliebener Serumanteil freigesetzt wird. Die Brüche erinnern morphologisch an brockelnde Gallerten. Bei Wiedererwärmung tauen die Gelmassen wie schmelzendes Eis ab.

C. Von den paraproteinämischen Seren mit stark *erhöhter Kälteviskosität* standen uns bisher 5 für phasenoptische Studien zur Verfügung. Es handelte sich um Seren, die nach Lagerung bei -30°C wieder aufgetaut worden waren, ihre abnorme viskose Eigenschaft aber in vollem Umfang behalten hatten. Sie zeigten abgesehen von dem Nebenbefund spärlicher amorpher Punkte, die sich bei Erwärmung nicht auflösten, keine phasenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen, die als morphologisches Korrelat der Kältehyperviskosität hätten angesprochen werden können.

normal serum: Water-labile serum proteins presented either a liquid or fine granular, amorphous type of precipitation.

Résumé

Dans 50 sérums normaux, 50 sérums dysprotéinémiques et 58 sérums paraprotéinémiques, nous avons étudié quelles étaient la fréquence et les quantités relatives des protéines cryolabiles et hydrolabiles, et quelles étaient leurs caractéristiques à la microscopie à contrastes de phases. Une précipitation par le froid de différents degrés se trouva 36 fois dans les sérums dysprotéinémiques et 37 fois dans les sérums paraprotéinémiques, mais par contre dans aucun des sérums normaux. Une gélification par le froid se produisit dans 6 des sérums paraprotéinémiques. Une augmentation de la viscosité indépendante du taux des protéides se trouva dans 30 des sérums paraprotéinémiques et dans 11 et 22 dans le froid en partie de façon disproportionnée. Les protéines hydrolabiles furent mises en évidence dans 11 sérums normaux, 38 sérums dysprotéinémiques et 30 sérums paraprotéinémiques, ces derniers donnant les opacités relativement les plus fortes. Des observations faites au microscope à contrastes de phases montrèrent que la précipitation par le froid se faisait principalement sous une forme de gouttes ou sous celle de grains amorphes qui souvent confluent par la suite. Les gels par le froid qui au début avaient un aspect homogène, présentèrent après vieillissement ou prirent des altérations mécaniques des déchirures et des fentes. Pour l'augmentation de la viscosité, nous avons pu trouver d'équivalent morphologique. Les protéines sériques hydrolabiles non précipitées sont sous une forme fluide soit sous celle de grains amorphes.

Literatur

1. BERNHARD, B., GROTH, H. AND FACKELSBUSCH, T. On the presence of high molecular cryallizable protein in blood serum in myeloma. *Folia haemat. (Lpz.)* 57: 184 (1958)
2. HOLMSTED, C. G. ET GROTHALL, A. Ein neues kristallines Serumglobulin. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 273: 199 (1942)
3. LIEBOWITZ, A. B. AND WATSON, C. J. Studies of cryoglobulins. Unusual patterns associated with the presence of high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin). *Amer. J. med. Sci.* 214: 410 (1947)
4. RIV, G. Das Serumweißbild. 2. Aufl., p. 349 (Huber Bern 1963)
5. SCHUBOTH, H. AND ALLEN, D. Paraproteinämie mit ungewöhnlich thermostabiler Erwärmungskurve. *Schweiz. med. Wochs.* 93: 646 (1963)
6. SCHUBOTH, H. AND ALLEN, D. Instabilitätsphänomene bei Paraproteinämie. *Med. Klin.* 57: 553 (1964)
7. SCHUBOTH, H., ALLEN, D. AND BETH, E. Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen an Kryopräzipitaten paraproteinämischer und dysproteinämischer Sera. *Schweiz. med. Wochs.* 94: 1380 (1964)
8. WALDENSTROM, J. Incipient myelomatosis of essential hypergammaglobulinemia with fibrinogenopenia. A new syndrome. *Acta med. scand.* 177: 216 (1944)
9. WETTERDA, M. M. A. BULL, M. V. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. With report of a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. *Bull. J. Am. Hosp. Assoc.* 1: 156 (1933)

I und II Innere Klinik der Medizinischen Universität Szeged

Untersuchung der Thrombocytopoese bei Perniciosa Kranken

Von K. RÁK, F. KRIZSA, L. VARGA UND I. CSERHÁTI

Es ist seit langem bekannt, daß bei den megaloblastären Anämien, so auch bei der durch Vitamin B₁₂-Mangel bedingten Perniciosa eine komplexe Störung der Häthropoese vorliegt. Außer der Anämie ist auch eine Verminderung der weißen Blutzellen und der Thrombocyten nachweisbar. Die Thrombocytopenie offenbart sich nicht selten in einer Blutungsneigung. Die richtige Behandlung, d.h. Vitamin B₁₂-Verabreichung hat eine Normalisierung aller drei blutbildenden Systeme zur Folge.

Bei gewissen Fällen von pathologischer Thrombocytopoese ist mit Hilfe des Mäuse Testes im Serum ein die Thrombocytenbildung stimulierender Faktor nachzuweisen (2, 3, 6, 7). Die Untersuchung dieser im Jahre 1958 von KELEMEN u. Mitarb. (2) beschriebenen Serumaktivität bei der Perniciosa war induziert, weil dieser Mangelzustand mit einer tiefgreifenden, aber reversiblen, gut beeinflussbaren Störung der Thrombocytopoese einhergeht, und weil einige frühere Beobachtungen auf die Möglichkeit humoraler Beziehungen zwischen Erythrocyten und Thrombocytenbildung aufmerksam gemacht haben.

In unserem bisherigen Material war in einem bedeutenden Prozentsatz der Kranken mit dieser Aktivität das Knochenmark hyperzellulär und gewöhnlich die Erythropoese ausgesprochen gesteigert, wie bei den Polycythämien, Hypersplenien und einigen Fällen von DI GUOLIZIO-schem Syndrom (7). Wir begannen zu untersuchen, ob bei der Perniciosa die ausgesprochene Knochenmarkhyperplasie und häthropoetische Zelltatigkeit nach Vitamin B₁₂-Zufuhr hinsichtlich der Thrombocytopoese von einer nennenswerten humoralen Veränderung begleitet sind. Da wir in einigen

Fällen ein gut reproduzierbares Phänomen beobachteten, haben wir die Beziehungen zwischen dem Verlauf der Thrombocytenzahl und der Serumaktivität von Perniciosa Kranken in der ersten Phase der Vitamin B₁₂-Behandlung eingehender untersucht.

Untersuchungsmaterial und Methoden

Während der vergangenen zwei Jahre haben wir die Thrombocytopoese von 19 unbehandelten Perniciosa-Kranken untersucht, nur einer von ihnen hatte vor Jahren Vitamin B₁₂ erhalten. Bei sämtlichen Patienten lag die Erythrocytenzahl unter 2,0 Millionen. Die Kontrolluntersuchungen fanden an Individuen ohne klinische Abweichungen statt. Zu Beginn der B₁₂-Therapie wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten nach der ersten Injektion die Thrombocytopoese verursachende Aktivität des beim erkrankten Patienten entnommenen Serums im Mäusetest untersucht. Von den zu prüfenden Sera erhielten Gruppen von 5 Mäusen (0,5 ml pro Tier intraperitoneal) injiziert. Die Thrombocytenzahl der Tiere wurde am dem Schwanzblut vor der Lyktion, sowie 3 und 5 Tage nachher bestimmt. Als maßgebend wurden die ausgesprochenen Veränderungen betrachtet und die Durchschnittswerte pro Mäusegruppe errechnet. Zur Thrombocytenzählung bedienten wir uns der direkten phasenkontrastmikroskopischen Methode von FACTA und GUSTAF (1). Als positive Wirkung wurde durchsichtliche Erhöhungen der Thrombocytenzahl um mehr als 50% betrachtet.

Die Fraktionierung der menschlichen Serumproteine erfolgte mittels Apatit-Elektrophorese. Im Anschluß an die wegen des Verträglichkeits nötiger Dialyse wurde die Reinheit der Fraktionen immunoelektrophoretisch nach der GRAHAM WILLIAMSschen Technik in der Modifikation von SOMMERLOCH kontrolliert (2).

Ergebnisse

Die wichtigsten klinischen und Laboratoriumsdaten der Perniciosa Kranken sind in Tabelle I zusammengefaßt. Außer der Perniciosa lagen im 3. Falle ein Darm Karzinoid und im 7. und 8. Falle eine generalisierte Arteriosklerose vor. Das Knochenmarksbild war in sämtlichen Fällen megaloblastär und (mit Ausnahme des 2. und 3. Falles) typisch. In den Fällen 2 und 3 war die Reifungshemmung nur mäßig und es bestanden beträchtliche erythropoetische Hyperplasie und lebhaftige Zellteilung. Abgesehen von dem zweiten Fall hatten alle Patienten vor der Behandlung eine Thrombocytopenie. Obwohl bei den ersten 7 Patienten die Zahl der Thrombocyten nach der Behandlung nur vereinzelt untersucht wurde war bei vier eine Vermehrung festzustellen. Bei drei Fällen fanden systematische Thrombocytenzählungen statt. Tabelle I veranschaulicht auch das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchung des Serums der Kranken im Mäusetest. Mit Ausnahme des dritten Falles war das vor der Behandlung gewonnene Serum in jedem Falle negativ. Das 48 Stunden nach der ersten Behandlung (20–300 µg Vitamin B₁₂) entnommene Serum dagegen hatte

Tabelle I
Einige klinische und Laboratoriumsbefunde der Perniciosa-Kranken

an- schlie- ßend	Klinische Diagnose	Knochenmark	Thrombocytenzahl vor Behandlung	Thrombocytenzahl nach Behandlung	Die Mäusen-Thrombocyten verstrichene Aktivität des Serums
J. 9	Anämia perniciosa	typisch	100.000	165.000 (am 6. Tage)	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 120 µg B ₁₂ am 3. Tage + 60%
J. 8	Anämia perniciosa	Megaloblastose, mäßige Reifehemmung	170.000	—	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B ₁₂ am 3. Tage + 40%, am 5. Tage er- neut 300 µg, Serumwirkung am 5. Tage + 38%
J. 9	Anämia perniciosa, Gastricoid	Megaloblastose, mäßige Reife- hemmung, lebhaftes Erythropoese	—	—	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung am 3. Tage + 32%, 48 Std. nach der In- jektion von 300 µg B ₁₂ am 5. Tage + 26%
L. 9	Anämia perniciosa	typisch	100.000	190.000 (am 6. Tage)	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B ₁₂ am 3. Tage + 56%
J. 9	Anämia perniciosa	typisch	115.000	—	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg., 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B ₁₂ am 5. Tage + 63%
L. 9	Anämia perniciosa	typisch	80.000	160.000 (am 5. Tage)	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 20 µg B ₁₂ am 3. Tage + 48%, 48 Std. nach am 3. Tage verab. 300 µg am 5. Tage + 34%
L. P. 9	Anämia perniciosa, Arteriosklerose	typisch	95.000	210.000 (am der 4. Woche)	Vor der Vitamin B ₁₂ Behandlung neg., 48 Std. nach der Injektion von 60 µg B ₁₂ am 3. Tage + 70%
L. J. 8	Anämia perniciosa, Arteriosklerose	typisch	75.000	390.000 (Max. am 14. Tage)	} siehe Abbildungen 1, 2 und 3
L. P. 9	Anämia perniciosa	typisch	60.000	300.000 (Max. am 14. Tage)	
L. J. 9	Anämia perniciosa	typisch	70.000	350.000 (Max. am 15. Tage)	

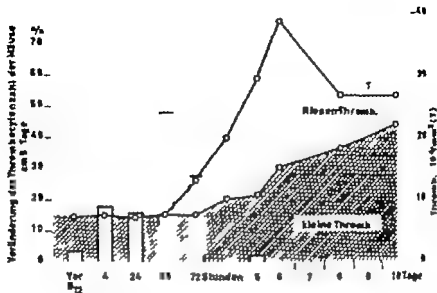


Abb. 1 Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 60 μg Vitamin B_{12} bei Fall Nr. 8.

eine wesentliche Erhöhung der Thrombocytenzahl zur Folge, die mit Ausnahme von Fall 3 mehr als 30% (40–70%) betrug mit einem Höchstwert am 3 bzw 5 Tage. Im Fall 3 bestand vor der Behandlung eine mäßige Serumpositivität, die nach Zufuhr von 300 μg Vitamin B_{12} nicht mehr nachweisbar war. Die Veränderungen der Thrombocytenzahl und der Serumaktivität der Patienten 8, 9 und 10 sind in Abbildung 1, 2 und 3 dargestellt. Die Säulen stellen die im Mäusetest beobachtete Wirkung der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Sera dar. Bezogen auf den Ausgangswert, sowie die 4 und 24 Stunden nach der Vitamin B_{12} -Injektion gewonnenen Werte betrug die am 5 Tage beobachtete Veränderung unter 20%. Die 48-Stundenwerte waren auffallend hoch, und die in Fall 8 und 9 untersuchten 72-Stundenwerte bewegten sich um +30%, während die am 3. Tage erhaltenen Sera schon keine Aktivität mehr besaßen. Die Aktivität des 48-Stundenserums des Patienten Nr. 9 war mit Trypsin aufzuheben. Die Abbildungen geben die Zahl und die Größe der kreisförmigen Thrombocyten wieder, indem zwischen normal großen, d. h. den üblichen kleinen Thrombocyten und Elementen, die oft das 4 bis 5-fache der normalen Größe erreichen und entweder rund und oder unregelmäßige Konturen aufweisen (große Thrombo-

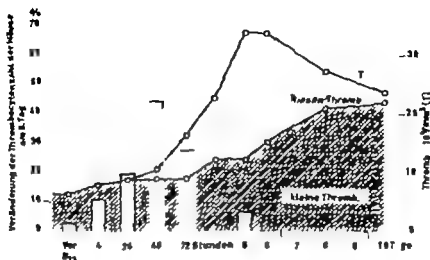


Abb. 2. Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 60 µg Vitamin B₁₂ bei Fall Nr. 9.

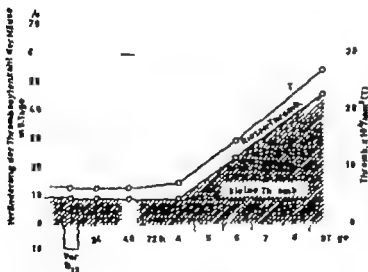


Abb. 3. Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 50 µg Vitamin B₁₂ bei Fall Nr. 10.

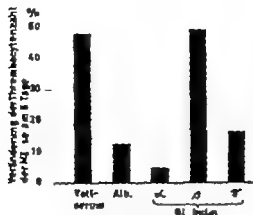


Abb. 4 Wirkung des 48 Stunden nach der Verabreichung von 60 µg Vitamin B₁₂ beim Fall Nr. 8 gewonnenen Serums, bzw. seiner Erweißfraktionen auf die Thrombocytenzahl von Mäusen.

cyten) unterschieden wird. In Fall 10 waren die großen Thrombocyten in geringer Zahl auch schon vor der Behandlung zu beobachten, und haben nach der Behandlung nicht zugenommen. Bei den Patienten Nr. 8 und 9 waren für die beträchtliche frühe Zunahme der Thrombocyten insbesondere diese Zellen verantwortlich, während die Vermehrung der als normal beurteilten Thrombocyten nur allmählich einsetzte. (Eine ähnliche Erscheinung sahen wir schon früher z.B. nach wegen Thrombocytopenie vorgenommener Splenektomie bzw. bei Prednisolonbehandlung in der Phase der Erhöhung der Thrombocyten.) Bei den drei eingehend untersuchten Fällen war das Maximum am 13. bzw. 14. Tage zu beobachten, wobei die meisten Thrombocyten die kleine regelmäßig-runde Form aufwiesen.

Abbildung 4 veranschaulicht die Wirkung des 48 Stunden nach der Behandlung mit 60 µg Vitamin B₁₂ vom Patienten Nr. 8 erhaltenen Serums, bzw. seiner Erweißfraktionen. Das Vollserum und seine β-Globulinfraction zeigten nahezu die gleiche Aktivität (+ 48 bzw. + 49 %) während die übrigen Fraktionen sich als unwirksam erwiesen. Es wurden auch die 72 Stunden-Serumfraktionen des Kranken Nr. 9 untersucht. Hier hatte das Vollserum eine Aktivität von + 28 % und die β-Globuline eine solche von + 40 %. Das 48-Stunden-Vollserum des Patienten Nr. 10 bewirkte

eine Erhöhung der Thrombocytenzahl um + 60 / und die β -Globulinfraction um + 38 %

Zur Kontrolle wurde die Serumaktivität von Pernicioso Kranken mit totaler klinischer und hämatologischer Remission vor und nach Zufuhr neuer Vitamin B₁₂-Dosen geprüft. Das Serum des Patienten Nr 7 erwies sich bei der Untersuchung während der Remission vor und 48 Stunden nach der Injektion von 60 μ g Vitamin B₁₂ im Mäusetest als unwirksam. Ähnlich negativ wurde das Serum eines behandelten, in diesem Material nicht angeführten Pernicioso-Kranken 48 Stunden nach der Verabreichung von 500 μ g Vitamin B₁₂ befunden. Das Serum von zwei hämatologisch normalen Individuen zeigte vor bzw 4 und 48 Stunden nach Zufuhr von 60 μ g Vitamin B₁₂ keine Thrombocytose auslösende Aktivität.

Schließlich wurde die Thrombocytenzahl der Mäuse am 3. und 5. Tage nach der i.p. Injektion verschieden hoher Dosen Vitamin B₁₂ kontrolliert. 2,0–15,0 μ g hatten höchstens eine mäßige Erhöhung zur Folge. Die maximale Erhöhung war nach Verabreichung von 2,0 μ g zu verzeichnen, Veränderungen von über + 30 / waren in keiner einzigen Gruppe feststellbar.

In Anbetracht des Phenolgehaltes der Vitamin B₁₂-Präparate wurde auch die Wirkung von 0,5 ml 0,1 %iger Phenollösung auf die Thrombocytenzahl der Maus untersucht; eine nennenswerte Änderung war bis zum 5. Tage nicht zu beobachten.

Besprechung

Die Thrombocytopoese sowie die qualitativen und quantitativen Anomalien der Megakaryocyten Pernicioso-Kranker sind bekannt (11). Bei megaloblastären Anämien, so vor allem bei der Pernicioso, kann klinisch die durch die Thrombocytopenie bedingte Blutungsneigung im Vordergrund stehen (9). Die quantitativen, und vor allem die qualitativen Veränderungen der Thrombocyten nach der ersten wirksamen Vitamin B₁₂-Dosis und weniger genau untersucht. Nach SMITH und Mitarb. (9) tritt die anfängliche Plättchen-Erhöhung mehr oder minder simultan mit der Retikulozytenkrise auf. Untersuchungen über begleitende, das Thrombocytensystem betreffende humorale Erscheinungen sind uns nicht bekannt.

Die Seren der 10 Perniciosa Kranken waren vor der Vitamin B_{12} -Behandlung im Mäusetest wirkungslos. Die Thrombocytose hervorrufende Serumaktivität geht fast regelmäßig dem auf die Behandlung folgenden Thrombocytenanstieg voran. Sehr gut zu beobachten war dieser Zusammenhang in unseren drei letzten Fällen. Eine Ausnahme bildete nur ein Fall, wo die Beurteilung durch eine Begleitkrankheit gestört war.

Um die Frage nach dem Zusammenhang der Vitamin B_{12} -Wirkung mit der Thrombocytopoese zu beantworten, muß geklärt werden, ob das Vitamin B_{12} unter physiologischen Bedingungen das Thrombocytensystem beeinflußt. Auf Grund orientierender Kontrolluntersuchungen ist dies nicht der Fall. Hämatologisch gesunde Personen und in der Remission befindliche Perniciosa Kranke reagieren auf die Vitamin B_{12} -Gabe nicht in gleicher Weise wie unbehandelte Perniciosa Kranke. Bei Mäusen haben verschieden hohe Dosen von Vitamin B_{12} keine signifikante Veränderung der Thrombocytenzahl zur Folge. Es ist daher unwahrscheinlich, daß bei unseren Untersuchungen mit einer Wirkung des mit dem Serum übertragenen Vitamin B_{12} gerechnet werden muß. Es ist zu vermuten, daß der beobachtete Vitamin B_{12} -Effekt nur bei pathologischer Thrombocytopoese zur Geltung kommt, und auch hier in erster Linie bei pathologischer Thrombocytenbildung infolge eines Vitamin B_{12} -Mangels wie bei der perniziösen Anämie. (Unsere Beobachtungen schließen die Möglichkeit nicht aus, daß dieses Vitamin auch bei anderen Störungen der Thrombocytopoese wirksam ist).

Ferner stellt sich die Frage, wie die Thrombocytose verursachende Aktivität des Serums einmal behandelter Perniciosa Kranker sich zu der bisher untersuchten, in hämatologischem Krankengut scheinbar einheitlichen thrombocytopoetischen Serumaktivität verhält. Nach orientierenden Untersuchungen besteht darzwischen kein Unterschied. Die aktive Substanz ist in der β -Globulinfraction enthalten, sie ist nicht dialysierbar und bei Mäusen ist der maximale Anstieg der Thrombocytenzahl ebenfalls am 5. Tage zu beobachten.

Hängt die durch Vitamin B_{12} bedingte Veränderung der Thrombocytenzahl mit der vorübergehend nachweisbaren thrombocytopoetischen Aktivität des Serums zusammen? Die Beantwortung dieser Frage würde gleichzeitig den Einfluß von Vitamin B_{12}

auf die pathologische Thrombocytopoese Perniciosa-Kranker erklären. In erster Linie kommen drei Möglichkeiten in Frage, die in Abb. 5 dargestellt sind.

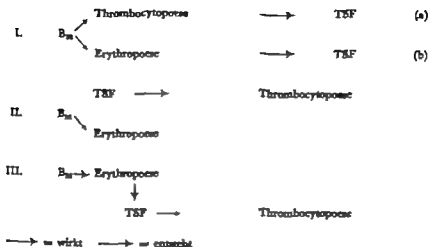


Abb. 5

I Bei Mangel an Vitamin B₁₂ ist in Anbetracht der gestörten DNA-Synthese die Reife- und Teilungstörung der DNA-synthetisierenden Zellen des Megakaryocytensystems und des Präkursorensystems wohl zu erklären. Bei Zufuhr des fehlenden Faktors wird das Gleichgewicht – ohne Mitwirkung irgendeines humoralen Faktors – wiederhergestellt und vermutlich gleichzeitig auch die Erythropoese wieder in die richtige Bahn gelenkt. Alldem geht eine intensive Zelltätigkeit beider Systeme voraus, und es ist vorstellbar, daß der Thrombocytopoese-stimulierende Faktor (TSP) das Produkt dieses Vorganges ist. Er kann ein humorales Nebenprodukt der Thrombocytopoese (a) aber auch der Erythropoese (b) sein. Nach dieser Vorstellung besitzt der TSP bei der Erhöhung der Thrombocytenzahl Perniciosa-Kranker keine kausale Rolle.

II Das Vitamin B₁₂ führt außer seiner Wirkung auf die Erythropoese auf bisher unbekannte Weise und von unbekanntem Orte aus auch eine Freisetzung von TSP. Das Auftreten der Akti-

vität ist nach einer gewissen Zeit von einer Erhöhung der Thrombocytenzahl gefolgt. Hier erhebt sich u. a. auch die Frage, ob diese Vorstellung mit den bisherigen Kenntnissen über die Dynamik der Thrombocytopoese vereinbar ist. Wenn die Wirkung des Poetins irgendeines Blut Zellsystems auf der Stufe der sog Urzellen (stem cell) zur Geltung kommt – wie es vor allem mit Bezug auf das erythropoetische System auch LAJTHA (5) annimmt – so muß zwischen dem Erscheinen der Aktivität und der Veränderung der Zellzahl ein gewisses – in Tagen auszudrückendes – Intervall bestehen. In diesem Sinne würde die frühe periphere Wirkung nicht das Ergebnis eines Poetin-Stimulus sein. Bei zwei Perniciosa kranken war am Tage nach dem Nachweis der Aktivität die Thrombocytenzahl schon wesentlich erhöht, und am 4 Tage darauf hatte die Thrombocytose bereits ihr Maximum erreicht (Abb. 1 und 2). Für die Thrombocytenvermehrung sind aber jugendliche, unregelmäßige, als pathologisch zu betrachtende große Plättchen verantwortlich und die Vermehrung der üblichen, sog kleinen Thrombocyten setzt erst am 3 bis 4 auf das Aktivitätsmaximum folgenden Tage ein. Beim dritten Fall (Abb. 3) bestand in den ersten 48 Stunden überhaupt keine Thrombocytenvermehrung dabei ist ein Intervall von mindestens 48 Stunden nach der Vitamin B_{12} -Injektion in jedem Falle zu beobachten. Da man heute im Bereich der Erythropoese unter dem Einfluß des Erythropoetins auch eine unregelmäßige Zellteilung sog 'akrippet division' vermutet (10) ist es andererseits möglich, daß die innert drei Tagen erscheinenden großen Thrombocyten nicht unmittelbar von Urzellen abstammen, bzw nicht Produkte des normalen, sondern des stimulierten Reifeprozesses sind. Ähnliche Frühreaktionen sind wir bereits auch in Verbindung mit der medikamentösen (Prednison) Beeinflussung von ITP Fällen, bzw im Anschluß an Splenektomien begegnet, d.h. in Situationen, wo eine Neubildung dieser Zellen schwer zu leugnen gewesen wäre. Diese zweite Theorie schreibt also dem TSF beim Zustandekommen der Thrombocytose eine ätiologische Rolle zu.

III Die Thrombocytose hervorrufende Aktivität des Vitamin B_{12} ist endlich auch als eine Wirkung auf das erythropoetische System denkbar. Die Richtigkeit dieser Annahme würde den bei Krankheiten des erythropoetischen Systems beobachteten Nachweis des TSF erklären. Obzwar – wie eingangs erwähnt – die vorliegende Untersuchungsreihe wenigstens teilweise einer solchen

Vorstellung zu verdanken ist, erscheint diese dritte Theorie doch am wenigsten gestützt.

Vor den auf verschiedene Weise hervorgerufenen akuten Mäuse-Thrombocytosen, sowie vor den Thrombocytenzahlerhöhungen verschiedener Pathogenese beim Menschen zeigt das Serum fast regelmäßig eine Thrombocytose verursachende Aktivität (4) Auch die hier vorliegende Beobachtung zeigt diesen Befund.

Es scheint angebracht, die Wirkung des Vitamin B_{12} über die perniciöse Anämie hinaus auch in Fällen andersartiger Störungen der Thrombocytopoese zu untersuchen.

Zusammenfassung

Es wurde die Thrombocytopoese an zehn unbehandelten Perniciöse-Kranken in der ersten Phase der Vitamin B_{12} -Behandlung untersucht. Das Serum der Kranken war vor der Behandlung im Mäusetest negativ während es 48 (und in geringerem Grade 72) Stunden nach der ersten wirksamen Vitamin B_{12} -Dosis eine Thrombocytose anzeigte. Zu einem späteren Zeitpunkt war diese Aktivität nicht mehr nachweisbar. Die Thrombocytenzahl der Kranken begann anzusteigen am Tage, nachdem die Aktivität nachzuweisen war. Die Eigenschaften der Aktivität stimmen überein mit denjenigen des thrombopoetischen Serumfaktors, der an einem hämatologischen Krankengut zuvor beobachtet worden war. Wahrscheinlich beeinflusst das Vitamin B_{12} nur die pathologische Thrombocytopoese bei Mangelzuständen. Ob dem Thrombocytose bewirkenden Faktor bei der auf die Behandlung folgenden Erhöhung der Thrombocytenzahl eine kausale Rolle zukommt, bleibt vorerst unentschieden.

Summary

Thrombocytopoiesis was studied during the first stage of vitamin B_{12} treatment in ten previously untreated patients with pernicious anaemia. While the patients' serum was negative before treatment according to the mouse test, 48 and, to lesser extent, 72 hours after the first effective dose B_{12} it produced thrombocytosis. This activity was no longer demonstrable at later stage. The patients' platelet count began to rise the day after this activity was first seen. The properties of this activity agree with those of the thrombopoietic factor found in the serum of haematological patients previously. Vitamin B_{12} evidently only affects pathological thrombopoiesis in the presence of deficiency. It is not yet clear whether the factor promoting thrombocytosis is responsible for the increase in platelet count following the treatment.

Résumé

Nous avons étudié la thrombocytopoïèse de malades atteints d'une anémie perniciëuse durant la première phase du traitement à la vitamine B_{12} . Le sérum de ces malades était négatif avant le traitement. 48 heures, et à un moindre degré 72 heures, après la première dose effective de vitamine B_{12} , il provoquait une thrombocytose. Après un cer

taux laps de temps, cette activité n'était plus démontrable. Le nombre des thrombocytes augmenta le jour suivant celui où l'activité put être démontrée. Les propriétés de cette activité correspondent à celle du facteur thrombocytopoïétique sérique qui fut observé au préalable chez des malades atteints d'affections hématologiques. La vitamine B₁₂ n'influence probablement que la thrombocytopoïèse pathologique dans les états déficitaires. La question de savoir si le facteur provoquant la thrombocytose joue un rôle dans l'augmentation du nombre des thrombocytes, lors de la thérapie, reste pour le moment en suspens.

Literatur

1. FROSTER, W. UND GERBER, W. D.: Über eine einfache Methode der direkten photomikroskopischen Thrombocytenzählung. Röntgen-Lab. Praxis 10: 49 (1957).
2. KELLERER, E., CSERHÁTI, I. AND TAVOS, B.: Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. Acta haemat. 20: 350 (1958).
3. KELLERER, E.; LEMOCERY, D.; PERKOVY, J.; CSERHÁTI, I. AND RÁK, K.: Serum thrombocytopoietic activity in idiopathic thrombocytopenic purpura. Lancet i. 1134 (1960).
4. KELLERER, E.; LEMOCERY, D.; CSERHÁTI, I.; KRIZA, F. AND RÁK, K.: Demonstrability of a serum factor inducing thrombocytosis prior to acute rises of platelets in mice and men. Acta haemat. 29: 15 (1963).
5. LAYMAN, L. G. AND OLIVER, R.: Studies on the kinetics of erythropoiesis; in Hemopoiesis, Cell Production and Its Regulation (Churchill, London 1960).
6. RÁK, K.: The humoral regulation of platelet production. Acta med. hung. 19: 67 (1963).
7. RÁK, K., LEMOCERY, D., KRIZA, F., CSERHÁTI, I. AND KELLERER, E.: Über die Thrombocytose verursachende Wirkung des Serums hämatologischer Kranker bei Mäusen. Folia haemat., N F 7: 8 (1963).
8. RÁK, K., VARGA, L., KRIZA, F. UND CSERHÁTI, I.: Die Wirkung von Erythroblasten normaler menschlicher Sera auf die Thrombocytenzahl der Mäuse. Experimentia 19: 136 (1963).
9. SMITH, M. D.; SMITH, D. A. AND FLETCHER, M.: Haemorrhage associated with thrombocytopenia in megaloblastic anaemia. Brit. med. J. 1 982 (1962).
10. STOWLMAN, F.: Erythropoiesis. New Engl. J. Med. 267: 342, 392 (1962).
11. WINTROBE, M.: Clinical Hematology (Lea & Febiger Philadelphia 1961).

Adress der Autoren: Drs. K. Rák, F. Kriza, L. Varga und I. Cserháti, I. und II. Innere Klinik der Med. Univ.-Klinik, Szeged (Ungarn).

Divisione Medica Talamona, Ospedale Maggiore, Milano
(Head Prof Livio Bural)

Acquired Idiopathic Hypoprothrombinaemia*

Acquired H₂ etc.

Secondary to Selective Deficient Absorption
of Vitamin K

By F DE CATALDO

Acquired hypoprothrombinaemia with a severe haemorrhagic diathesis may occur as a consequence of vitamin K deficiency in otherwise normal patients (1 2 3) In the previously recorded cases the vitamin K deficiency could not be referred to any of the known causes and its pathogenesis was obscure. The purpose of this paper is to report the case history of a patient with severe haemorrhages secondary to a combined deficiency of factor II (prothrombin) factor X (Stuart Prower) factor IX (PTC) and probably factor VII (proconvertin) Clinical and laboratory data seem to indicate a selective deficient absorption of vitamin K.

Case Report

The patient is 43 year old female. At the age of 20 she had pulmonary tuberculosis with pleural effusion; she suffered tuberculous spondylitis at the age of 22 and recurrence of the pulmonary process at the age of 35.

The only bleeding episodes in her past history are frequent epistaxis until she reached the age of eight and occasional bleeding from the gums. At the age of 14 she underwent tonsillectomy; at 17 bilateral inguinal herniorrhaphy; at 29 colectomy; at 39 appendectomy at 32 removal of polyp from the genital tract at 39 excision of varicose veins, at 41 splenectomy (we have not been able to ascertain why the latter operation was performed) It is very significant that none of the operations were complicated by haemorrhages.

In October 1962 the patient had an episode of thrombophlebitis on the left leg and received a short term treatment with an anticoagulant (Sintrom) complicated by numerous ecchymoses, bleeding from the gums, haematuria and hypoprothrombinaemia.

On March 3rd 1963 the patient was admitted to our department because of the persistent hypoprothrombinaemia and related haemorrhagic manifestations. Appetite, digestion and bowel function had always been normal.

An abstract of this paper has been presented at the meeting of the Società Italiana di Ematologia on June 12th, 1964 in Milan.

On admission physical examination showed a well developed and well nourished female in no acute distress. Several ecchymotic areas were noted on the limbs. Palpation of the abdomen did not elicit pain or discomfort. Liver was not palpable. The scars of the previous surgical procedures were evident. The examination did not reveal other abnormal findings.

Routine laboratory tests: Haemoglobin 15 g per 100 ml; red cells 4.3 millions per cu. mm., packed cell volume 42%, reticulocytes 0.5%. Leucocytes count 7000 per cu mm with a normal differential count. Urinalysis revealed numerous red blood cells in the sediment without other abnormal findings. Tests for occult blood in the stools were negative.

Table I

Correction of patient one stage prothrombin time Russell Viper Venom (Soy-ven) as indicated.

Mixtures		Clotting time in seconds
Normal plasma		13
Patient's plasma		94-100
Patient plasma	0.8 cc	95-100
BaSO ₄ -treated		
Bovine plasma	0.2 cc	
Patient's plasma	0.8 cc	20
Aged normal		
Human serum	0.2 cc	
Patient's plasma	0.8 cc	16
Normal plasma	0.2 cc	
Normal plasma	(Soyven)	14
Patient's plasma	(Soyven)	37-42

Blood coagulation studies: Clotting time (LEE AND WHITE) 13 minutes; clotting time in silicone 60 minutes (normal 35-45 minutes); bleeding time (Duke) 3 minutes; platelet count 250 000 per cu mm. Clot retraction: complete retraction in two hours at 37 °C. One stage prothrombin time 100 seconds (normal 11 seconds); prothrombin consumption 90%; plasma prothrombin concentration 25% (OWREN AND AAM). Correction experiments were carried out in order to characterize the deficit responsible for the prolonged one stage prothrombin time (table I).

The results of the thromboplastin generation test with cross experiments with the serum from a known case of factor IX deficiency are recorded in table II.

The patient was then started on vitamin K₁ (Konaktion-Roche) 10 mg intravenously daily for 10 days. The one stage prothrombin time performed after treatment was 14 seconds. The thromboplastin generation test was normal. It was evident at this point that the hemorrhages were secondary to acquired hypoprote thrombinaemia secondary to vitamin K deficiency. Further studies were undertaken to clarify its etiology.

Table II
Thromboplastin Generation Test

Al (OH) ₃ -treated plasma	N	P	N	P	N	P
Serum	N	P	N	P	P	X
Factor suspension	N	P	P	P	N	P
Substrate plasma	N	P	N	N	N	N
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	28	—	—
3	43 ⁰ / ₃₀	—	—	13	—	—
4	25	—	38	10	—	—
5	14 ⁰ / ₃₀	—	19	8	—	33
6	11 ⁰ / ₃₀	—	15	8	—	33
7	9	31	12	8	34	23 ⁰ / ₃₀
8	9	24	11	8	36	17
9	8 ⁰ / ₃₀	21	11	8	37	15 ⁰ / ₃₀
10	9	17	11	8	37	—

N = normal; P = patient; X = mixture of equal parts of patient's serum and factor IX deficient serum.

Liver function tests: Serum bilirubin 0.4 mg per 100 ml; cholesterol 280 mg per 100 ml; bromsulphalein retraction 6% at 30 minutes and 7% at 45 minutes. Takata, Mac Lagan and Koike's reactions negative. Total serum proteins 6.7 g per 100 ml; albumin 3.94 g per 100 ml; α_1 -globulin 0.22 per 100 ml; α_2 -globulin 0.67 per 100 ml; β -globulin 0.85 per 100 ml; γ -globulin 1.02 per 100 ml.

Stool X-ray and digestive tract series were normal.

Bone marrow examination showed that all series were normally active.

Stilling test: was performed administering to the patient 1 μ g of Co⁵⁷-labelled vitamin B₁₂; urinary excretion 14.8%.

¹²⁵I-labelled triolein test: The test was performed administering to the patient 50 μ c of ¹²⁵I-labelled triolein, diluted in 30 ml of milk. Thyroid uptake of ¹²⁵I was blocked over the test-period by the daily administration of 20 drops of Lugol's iodine. Stools were collected for 5 days. The stool specimens were adjusted to standard weight with water and homogenized in shaker. The standard solution and the specimens were assayed in well-type scintillation counter. ¹²⁵I-triolein excretion in feces 1.35%.

On April 24th 1963 the patient was discharged to be followed at in the out-patient clinic and the treatment was discontinued. The patient returned to the out-patient haematology clinic on November 2nd 1963. The one stage prothrombin time was 32%. No signs of haemorrhage were noted and it was decided to restart the oral treatment (Konakion 20 mg daily). On November 23rd. 1963 the one stage prothrombin time was 30% of the normal control. It raised to 100% following intravenous treatment (Konakion 10 mg daily). Upon discontinuance of Konakion the one stage prothrombin time returned to the previous low level. Oral administration of the hydrolysable form of vitamin K was also effective in raising and maintaining the one stage prothrombin time in a normal range.

Discussion

Thus the patient has a combined deficiency of factor II (prothrombin) factor IX (PTC) factor X (Prower-Stuart) and probably factor VII.

The deficiency of factor II is demonstrated by the correction of the patient's prothrombin time (100 seconds) obtained by the addition of normal plasma (16 seconds) the quantitative assay of prothrombin by the method of OWSEN Aas was 25% of the normal.

Bovine plasma absorbed with BaSO_4 failed to correct the patient's one stage prothrombin time. Factor V (accelerator globulin) was therefore considered normal.

Deficiency of factor X is demonstrated by the prolonged one stage prothrombin time performed using Russel's viper venom and lipoid and by the abnormal thromboplastin generation test.

The possibility of factor IX (PTC) deficiency was also taken into consideration.

In table II the result of the thromboplastin generation test using a mixture of the patient's serum with the serum of a known case of factor IX deficiency is reported. It is evident that no correction could be expected in the thromboplastin generation test of the factor IX deficient patient substituting his serum with the serum of the patient under discussion. The platelets and the absorbed plasma of our patient showed normal clotting activity. The incomplete correction obtained may be explained by a deficiency of both serum factors involved in the generation of intrinsic thromboplastin. In fact if our patient was lacking exclusively factor X, the mixture with factor IX deficient serum should have caused almost complete correction in the thromboplastin generation test. The experiment shows that when normal serum was used the minimum clotting time

was 8 seconds with the mixture the minimum clotting time was 16 seconds and 6/10

It is difficult to prove factor VII deficiency in this case because of the concomitant deficiency of factor X. Unfortunately a factor VII deficient plasma was not available.

The hypoprothrombinaemia has been corrected either by the intravenous administration of vitamin K₁ or by oral administration of the hydrosoluble form. The oral treatment with vitamin K₁ has been ineffective. The behavior points at a deficient absorption of vitamin K.

The patient has no evidence of liver disease. The liver was not enlarged at physical examination bilirubin, bromosulphalein retention, serum electrophoresis and cholesterol were normal. The response to the treatment may be considered as additional evidence of liver integrity. The patient had never complained of symptoms which could be attributed to a malabsorption syndrome. The haemorrhagic manifestations were the only clinical problem. The roentgenologic examination of the digestive tract failed to show any abnormality. The patient was not anaemic. Oral glucose tolerance test, Shilling and P¹⁰³ triolein tests were all normal. Why this patient is not absorbing vitamin K is not clear. She has been followed for over a year and under oral treatment with hydrosoluble vitamin K she has been in very good health. We can only speculate that her abnormality involves the selective absorption of vitamin K.

Summary

A case of acquired deficiency of factor II, IX, X and probably of factor VII is reported. The hypoprothrombinaemia associated to factor IX deficiency seems secondary to selective deficient absorption of vitamin K without evidence of malabsorption.

Zusammenfassung

Es wird über einen Fall von erworbenem Mangel an Faktor II, IX, X und wahrscheinlich auch VII berichtet. Die Hypoprothrombinämie und der Mangel an Faktor IX scheinen durch eine selektive Störung der Resorption von Vitamin K ohne Zeichen eines Malabsorptionssyndromes bedingt zu sein.

Résumé

Nous rapportons un cas d'un manque acquis des facteurs II, IX, X et probablement VII. L'hypoprothrombinémie et le manque de facteur IX semblent être causés par une perturbation isolée de la résorption de la vitamine K sans aucun signe d'un syndrome de malabsorption.

References

1. HEDNER, L. A.; ANDERSON, B.G. AND FRIEDLANDER, R. D. Acute idiopathic hypoprothrombinemia: response to massive doses of vitamin K. *Ann. intern. Med.* 29, 347-363 (1948)
2. LEWIS, S. H. AND BEDDERT, L. L. A study of factors A and B of prothrombin. *J. clin. Invest.* 26, 1137 (1947)
3. LAY, A. B.: Idiopathic hypoprothrombinemia associated with hemorrhagic diathesis and the effect of vitamin K. *Blood* 6, 740 (1951).
4. SPART, T. H. Clinical implications of acquired blood coagulation abnormalities. *Blood* 23, 839 (1964)

Autore' address: Dr F. de Cauda, Ospedale Maggiore, Piazza Ospedale Maggiore 2, Milano-Milano (Italy).

Ans der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg im Breisgau
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. HEILMEYER)

Untersuchungen über die Haemsynthese in roten Blutzellen

L. Mitteilung. Die Bildung von Fe^{2+} -Hämoglobin in Haemolysaten und Suspensionen
aus Kaninchenretikulozyten. Anwendung einer $\text{PIL } W$ zur Messung
des Haemehem

VON H. HENDEL, R. CLOTTEN UND L. HEILMEYER

Die Verbindung des Protoporphyrins und des Eisens zum Haem (Ferroprotoporphyrin) ist physiologischerweise ein enzymatischer Vorgang. Das spezifische Enzym, Haemsynthetase oder auch Ferrochelatase genannt, konnte bisher in kernhaltigen Vogel erythrozyten (5, 8, 9), kernhaltigen roten Knochenmarkszellen (23, 20, 17, 15, 13, 16, 18), Leberzellen (19) und kernlosen Retikulozyten (25, 11, 10, 16, 18, 19, 4) nachgewiesen werden; dabei dient die Menge des unter optimalen Bedingungen *in vitro* neu gebildeten Haems als Maß der Enzymaktivität. Da die Haembildung der Blutzellen von einer Reihe weiterer Faktoren, z. B. dem Vorhandensein von Protoporphyrin bzw. Protoporphyrinogen in optimaler Konzentration, der Bereitstellung zweiwertigen Eisens in geeigneter Form und wahrscheinlich der gleichzeitigen Bildung des Globins (21, 11) abhängt, ist eine quantitative Aussage über die Haemsynthetaseaktivität nur vergleichend bei identischen Versuchsbedingungen möglich. Unsere Versuche mit Kaninchenretikulozyten, die in Hinsicht auf spätere Untersuchungen der Haembildung bei menschlichen Haemsynthesestörungen (7) durchgeführt wurden, beziehen sich nicht nur auf den letzten enzymatischen Schritt der Blutfarbstoffbildung, sondern auch auf die dieser Reaktion vorgeschalteten Stoffwechselvorgänge, die für die Bereitstellung des Substrats in reaktionsfähiger Form verantwortlich sind.

Die bei *in vitro*-Versuchen mit Blutzellen gebildete Menge von Blutfarbstoff ist im Vergleich zu der bereits im Ansatz enthaltenen

Mit Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft.

so gering, daß der Zuwachs nicht durch die direkte Bestimmung des Reaktionsproduktes erfaßt werden kann. Zur Erfassung des neugebildeten Haems müssen vielmehr Isotopenmarkierte Substrate verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wird über den Einbau radioaktiven Eisens in das Haem *in vitro* berichtet. Diese Technik wurde von der Mehrzahl der obengenannten Autoren bei ähnlichen Untersuchungen verwendet. Da nur ein Teil des zugegebenen Radioeisens utillisiert wird, müssen zur Erfassung der Haemsynthese Haemeisen und Nicht Haemeisen nach der Inkubation getrennt werden. Die oben zitierten Autoren verwendeten dazu fast ausschließlich die Kristallisation des Haemins, die uns in der von FISCHER angegebenen Methode mit Rekristallisation nach STEIN *et al* (22) ebenfalls einwandfreie Ergebnisse lieferte. Ein Nachteil ist der große Zeitaufwand der Methode, der die Durchführung größerer Versuchsreihen erschwert. Nachdem Versuche mit Extraktionsmethoden unbefriedigend waren konnten wir eine rasche Isolierung des Haemeisen mit Hilfe einer Präzipitationsmethode erreichen, wobei nach den Angaben von MYHRZ (18) das an Proteine außer dem Haemoglobin gebundene Eisen durch Vorbehandlung mit Säure und Reduktionsmittel freigesetzt wurde. Da die von MYHRZ angegebene und von uns etwas modifizierte Technik unseres Erachtens einen wesentlichen Fortschritt für die Untersuchung der Haemsynthese darstellt, wird in der vorliegenden Arbeit auch kurz über die methodischen Vorversuche zur Anwendung der Präzipitationsmethode berichtet.

Methoden

Die Untersuchungen wurden an Erythrocyten von Kaninchen durchgeführt, bei denen durch Blutentzug eine Retikulozytose erzeugt worden war. Phenylhydrazin wurde wegen der dadurch bewirkten Stoffwechselstörung der roten Blutzellen nicht verwendet. Für die Inkubationsversuche wurden den Tieren jeweils 30-60 ml Blut mittels einer heparinisierten Spritze entnommen und die Erythrocyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Alle Arbeiten von der Entnahme bis zu Beginn der Inkubation wurden im Eiswasserbad bzw. in der Kühltrentrifuge bei 4 °C durchgeführt. Hämolysate aus den gewaschenen Zellen wurden mit Aqua bidest. und 0,15 mol Phosphatpuffer pH 7,4 im Verhältnis 1 : 1 : 1 hergestellt; zur Herstellung der Suspension wurde anstelle von Aqua bidest. 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet. In einzelnen Versuchen wurde auch mit 0,2 mol Trispuffer bzw. Krebs-Ringer Trispuffer gearbeitet. Zur Inkubation wurde meist 3 ml Hämolysat bzw. Suspension (= 1 ml Erythrocyten) im silikonisierten III ml Erklenmeyerkolben mit 0,1-0,3 μ C Fe⁵⁹ (Fe⁵⁹-Citrat, spec. Aktivität etwa 10 μ C/ μ g) und den entsprechenden Zusätzen gemischt und auf eine Gesamtreaktions von 5 ml gebracht. Bei Inkubation von ganzen Zellen wurden zur Verhinderung einer stärkeren mechanischen Hämolys 0,5 ml einer 10%igen Polyvinylpyrrolidonlösung zugesetzt. Die Temperatur des Wasserbads betrug 37 °C, die Rotationsgeschwindigkeit

lag etwa bei 30/min. Die Reaktion wurde nach 4 Std. durch Zugabe von KCN (10 mg/ml) oder rasches Abkühlen gestoppt.

Zur Abtrennung des Hämeleins mit Hilfe der Präzipitationsmethode wurde je 1 ml des inkubierten Hämolysats mit 3 ml 0,2 mol Acetatpuffer auf pH 4,5–4,6 gebracht, mit etwa 1 mg Natriumäthylsulfat versetzt und mindestens 10 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das pH durch Zugabe von 1 ml 2 N HCl auf unter 1 gesenkt, um unauflösliches Eisen freizusetzen. Anschließend wurde mit 20%iger Trichloroessigsäure gefällt und das Präzipitat zweimal mit etwas 10%iger Trichloroessigsäure sowie zweimal mit H₂O gewaschen. Die Radioaktivität des Präzipitats wurde im Zentrifugenröhrchen im Bohrkochkristall gemessen und mit einer gleichen Menge des nicht präzipitierten Hämolysats bzw. mit einer an derselben Probe vor Präzipitation vorgenommenen Messung verglichen.

In einigen Vergleichsversuchen wurde das Haem als Ferroprotoporphyrinchlorid nach der Methode von Fischer kristallisiert, gewaschen und einmal aus Pyridin rekristallisiert. Dabei wurde vor der Verarbeitung 30 ml Trägerhämolysat zugesetzt, so daß die Ausgangsmenge bei 2–3 g Hämoglobin lag. Die Ausbeute an rekristallisiertem Haem betrug 50–70%, der theoretisch erwarteten, die auf der Basis des Molekulargewichtes des Hämoglobins von 68.000 errechnet wurde. Das Rekristallat wurde nach Wägung wieder in 2 ml Pyridin aufgenommen, ebenfalls im Bohrkochkristall gemessen und mit einem Standard des Ausgangshämolysats verglichen.

Die Messungen erfolgten im Bohrkochzählrohr mit einem Geiger-Müller-Zählrohr. Der Leerwert lag bei einer Einstellung bei 100–150 l. p. c., die Ausbeute bei etwa 30%. Außer bei Kontrollversuchen mit sehr geringer Aktivität wurden mindestens 5000 Impulse ausgemittelt, so daß der statistische Zählfehler unter 3%, meist unter 1% lag. Die Menge des im Haem wiedergefundenen Radiohems als relatives Maß der Haembildung wurde in % der zugesetzten Radioaktivität angegeben.

Fe⁵⁹-Citrat wurde als isotonische Lösung der Firma Abbott bezogen und mit der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Glycin und δ -Aminolävulinat (δ -ALA) wurde in Form des Hydrochlorids in Aqua dest. oder HCl gelöst. Protoporphyrinchlorid wurde aus künstlichem Protoporphyrin nach Reinigung über den Methylester und dessen Salzsäurehydrolyse kristallisiert.

Hämoglobinhemmungen erfolgten nach der Cyanhämoglobinemethode, der Berechnung wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{540} = 11,0$ zugrundegelegt. Der Hämatokrit wurde nach der Kapillärhämatokritmethode bestimmt. Die Retikulozytenzählung erfolgte nach Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau. Eisenbestimmungen wurden mit Hilfe der Bestophotenzentrifugalmethode durchgeführt.

Ergebnisse

1. Methodische Versuche zur Präzipitationsmethode

a) *Lösungsversuche* Menschliche Erythrozyten aus einer längere Zeit gelagerten Blutkonserve wurden gewaschen und mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 1 hämolysiert. 10 ml Hämolysat wurden mit 1 μ C Fe⁵⁹-Citrat in 10 ml Kochsalzlösung gemischt und 16 Proben dieser Mischung in der oben beschriebenen Weise präzipitiert und gewaschen. Die Radioaktivität des Präzipitats lag immer unter 0,2% des zugesetzten Fe⁵⁹. Im letzten Waschwasser fand sich keine meßbare Radioaktivität mehr. Wenn das gleiche Hämolysat mit

Phosphatpuffer Radioeisen und Protoporphyrin in optimaler Konzentration 4 Std. bei 37° inkubiert wurde, lag die Radioaktivität im Präzipitat mit 0,2–0,5 / der zugesetzten Menge etwas höher

b) *Versuche mit Fe^{59} Hämoglobin.* Ein Kaninchen erhielt 20 μ C Fe^{59} -Citrat i. v. injiziert. 8 Tage später wurde eine größere Blutprobe entnommen, die Erythrozyten gewaschen, mit Aqua dest. hämolysiert und 30 min bei 15000 Umdrehungen zentrifugiert. Im Präzipitat der überstehenden klaren Hämoglobininlösung war bei 10 Bestimmungen $97,6 \pm 1,2\%$ des Fe^{59} enthalten. Der Verlust an Hämoglobingebundenem Eisen bei der Präzipitation beträgt also höchstens 5%. Da ein geringer Teil des Fe^{59} sich als Nicht-Haemeisen in den Zellen befinden dürfte, ist der echte Verlust wahrscheinlich noch niedriger

c) *Versuche mit gleichzeitiger Kristallisation und Präzipitation.* Bei einer Reihe der später beschriebenen Inkubationsversuche wurde die prozentuale Fe^{59} -Radioaktivität sowohl im kristallisierten Häm wie im Präzipitat geprüft. Wie Abb. 1 zeigt, ergibt sich eine befriedigende Korrelation beider Methoden, wobei die Abweichung der mit beiden Methoden erhaltenen Einzelwerte maximal 10% betrug

Bei insgesamt 81 Doppelbestimmungen mit der Präzipitationsmethode aus demselben Ansatz lag die durchschnittliche Abweichung bei 2,1% des Mittelwertes. Dabei wurden allerdings nur An-

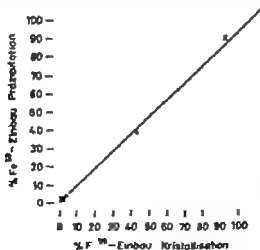


Abb. 1. Korrelation des Fe^{59} Haeme bei verschiedenen Inkubationsversuchen mit zwei Isolierungsmethoden. Der Wert x wurde durch die α -Markierung gewonnen. Der Eisen einbau bei 16% der zugesetzten Gesamt-radioaktivität angegeben.

sätze mit Einbauwerten von über 5 % berücksichtigt, bei denen eine ausreichend genaue Radioaktivitätsmessung im Präzipitat möglich war

2. Zeitlicher Verlauf des Fe^{59} Einbaus *in vitro*

In zwei Ansätzen, die jeweils 10 ml Erythrocyten enthielten, wurde der zeitliche Verlauf der Häm-synthese verfolgt. Die Ansätze wurden bei 4 °C hergestellt, die erste Meßprobe wurde direkt vor Einbringen in das Wasserbad, weitere Proben aus demselben Ansatz in den aus Abb. 2 ersichtlichen Zeitabschnitten entnommen. Die Reaktion in den entnommenen Proben wurde bei Versuch Nr. 133 durch sofortiges Mischen mit 1 ml einer 1 %igen KCN-Lösung, bei Versuch 203 durch Einbringen von je 1 ml in tiefe kühle Reagenzglasr gestoppt. Wie die Ergebnisse der bei jeder Entnahme vorgesehenen Doppelbestimmung des Hämoglobingebundenen Fe^{59} zeigten, wurde durch KCN die Reaktion zuver

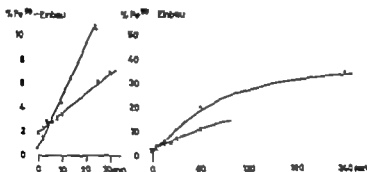


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Häm-synthese *in vitro*. Die Ansätze enthielten 5×10^{-4} mol Protoporphyrin und 1×10^{-4} mol Ascorbinsäure.

lässiger abgebremst als durch Abkühlung. Die letztere Methode wurde in Versuch 203 deswegen gewählt, weil eine Verhinderung der reduktiven Freisetzung des Eisens aus Ferritin durch das KCN vorstellbar wäre. Wie Abb. 2 zeigt, haben jedoch die Kurven der beiden Versuche prinzipiell den gleichen Verlauf. In den ersten 30 Minuten steigt der Anteil des hämoglobingebundenen Fe^{59} linear an, um nach 4 Std. etwa sein Maximum zu erreichen. Allerdings war ein gewisser weiterer Anstieg auch in den folgenden 16 Stunden in Versuch 203 zu erkennen.

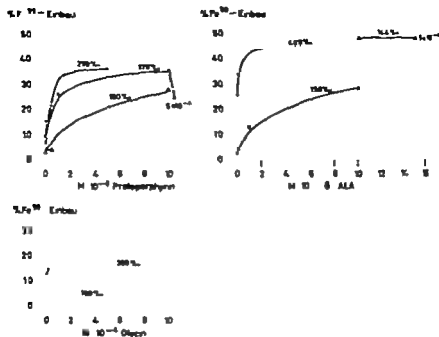


Abb 3. Stimulation der Haemsynthese in Reticulozytenhämolysaten durch verschiedene Konzentrationen von Protoporphyrin, δ -ALA und Glycin.

3. Abhängigkeit des Radioeisenanbaues in Hämolysaten von der Substratkonzentration

Der Fe^{59} Einbau liegt im Hämolysat aus Kaninchenerythrozyten nach vierstündiger Inkubation eindeutig über den beschriebenen Leerwerten, ist jedoch zumindest bei Reticulozytenzahlen unter 200‰ mit 1–5‰ relativ gering. Zusatz von δ -ALA oder Protoporphyrin bewirkt eine mehrfache Erhöhung der Haemsynthese, dagegen hat Glycin in vergleichbarer Konzentration keine deutliche Wirkung (Abb 3). Es fällt auf, daß bei höheren Reticulozytenzahlen mit entsprechend hohem Anteil unreifer Formen der Fe^{59} Einbau ohne Substrat beträchtlich höher liegt und schon geringe Konzentrationen der Substrate δ -ALA und Protoporphyrin eine optimale Stimulation der Haemsynthese bewirken. Nachdem wir die fehlende Utilisation des Glycins für die Haemsynthese im Reticulozytenhämolysat festgestellt hatten, wurden weitere Versuche mit Glycin in einer Konzentration von 1×10^{-4} mol unter Zusatz von Ascorbinsäure (5×10^{-4}) ATP (1×10^{-3} mol) und

Tabelle I

Vergleichende Untersuchung der Hämsynthese unter verschiedenen Bedingungen an denselben Retikulozyten. Glycinkonzentration 1×10^{-4} bis 1×10^{-3} mol. δ -ALA-Konzentration 1×10^{-4} bis 5×10^{-4} mol. Protoporphyrinkonzentration 5×10^{-4} bis 1×10^{-4} mol. Der Fe⁵⁵-Einbau ist in % der zugesetzten Gesamtradioaktivität angegeben.

Protokoll Nr.	Retikulozyten in	ohne Substrat	Hämolystat Glycin	δ -ALA	Protop.	Suspension ohne Substrat
174/176	100	1,9	1,3	27,6	16,1	—
209	120	40,1	42,9	35,3	68,3	83,0
168	140	6,5	7,0	41,7	42,3	49,9
171	140	4,1	—	—	45,0	44,9
196	140	1,6	1,4	18,2	51,4	66,0
85	150	2,4	—	—	32,0	47,0
154/158	150	2,8	2,0	28,4	28,4	—
206	300	16,0	20,0	23,0	30,0	73,0

Pyridoxalphosphat (1×10^{-3}) durchgeführt auch dabei zeigte sich keine Wirkung des Glycins trotz eindeutig positiver Kontrolle mit Protoporphyrin (16,1 / Einbau)

4. Vergleichende Versuche mit Zellsuspensionen und Hämolystaten

Suspensionen aus intakten Kaninchenretikulozyten zeigen im Gegensatz zu Hämolystaten einen sehr hohen Fe⁵⁵ Einbau in das Hämoglobin auch ohne Zusatz von Substrat. In Tabelle I sind die Ergebnisse von mehreren Inkubationsversuchen aufgeführt, bei denen Suspensionen und Hämolystate mit verschiedenem Substratzusatz unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Die Hämbildung ist in Suspensionen auch ohne Substratzusatz immer höher als in entsprechenden Hämolystaten. Nur in den Versuchen 168 und 171 in denen δ -ALA bzw. Protoporphyrin zugesetzt wurden, werden die bei den Zellsuspensionen zu beobachtenden Einbausraten annähernd erreicht. Zwischen den beiden Substraten besteht in bezug auf die Steigerung der Hämsynthese kein sicherer quantitativer Unterschied. Glycinzusatz in vergleichbarer Konzentration erbrachte ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen keine wesentliche Steigerung der Hämsynthese. Die Versuche Nr. 206 und 209 wurden mit den Erythrozyten eines Tieres vorgenommen, dem wir über 10 Tage mehrmals größere Blutmengen entnommen hatten. Ebenso wie bei Versuch Nr. 122 und 124 (Abb. 2) zu dem auch die Erythrozyten eines mehrmals stark entbluteten Tieres benutzt wurden, ist die Einbausrate im Hämoly-

Tabelle II

Fe^{59} -Einbau in das Hämoglobin von Retikulozytensuspensionen bei Zusatz verschiedener Substrate.

Protokoll Nr.	Retikulozyten /ml	ohne Substrat	Glycin	Suspension L-ALA	Protoporph.
172	100	39,6	27,8	42,0	33,2
225	30	37,8	29,2	25,8	50,5

sat auffällig hoch und die zusätzliche Haemsynthese bei Substratzusatz wenig ausgeprägt.

Zusatz von Substraten zu den Suspensionen hatte nur eine geringe Steigerung des Fe^{59} Einbaus in das Hämoglobin zur Folge (Tabelle II). In Kontrollansätzen, die 10 mg KCN enthielten oder vor der Inkubation 10 bis 20 min. auf 65° erhitzt worden waren, lag der prozentuale Eiseneinbau immer unter 2 %.

5. Wirkung reduzierender Substanzen

Von GOLDBERG *et al.* (5) und LOCHHEAD *et al.* (13) wurde eine Steigerung der Haembildung aus Protoporphyrin und Fe^{59} bei Zusatz reduzierender Substanzen wie Ascorbinsäure, Gluthation-SH und Ergothionin an Vogelerthrozyten und Kaninchenknochenmarkszellen nachgewiesen. Wir konnten mit Ascorbinsäure und Cystein nur eine geringe Steigerung des Eiseneinbaus erreichen (Tabelle III).

Tabelle III

Wirkung von Ascorbinsäure und Cystein auf die Haembildung im Retikulozytenhämolyzat. Protoporphyrinkonzentration 5×10^{-6} M. Der Fe^{59} -Einbau ist in % der zugeetzten Gesamtaktivität angegeben.

	—	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$1 \cdot 10^{-2}$ M
Ascorbinsäure	32,3	40,4	42,5	32,0
Cystein	32,3	32,5	30,3	43,6

6. Wirkung verschiedener Eisenkonzentrationen auf den Radioeisenbau

Der durch Verunreinigungen bedingte Eisengehalt in unseren Ansätzen (ohne Hämolyzat bzw. Zellen) lag unter der unteren Bestimmungsgrenze von 10 $\mu\text{g}/100$ ml, die Ansätze enthielten also weniger als 0,5 μg exogenen Eisens. Die mit Fe^{59} zugesetzte Eisenmenge ist bei der hohen spezifischen Aktivität (die verwandte Menge von 0,1 bis 0,3 μC entsprechen etwa 1×10^{-8} μg Eisen) zu

vernachlässigen. Zusatz von Trägerisen hat ein Abnken des relativen Fe^{59} Einbaus zur Folge, der jedoch hinter der Erhöhung der Eisenkonzentration im Ansatz zurückbleibt (Abb. 4). Man muß daraus schließen, daß entweder die Haemsynthese von der angebotenen Eisenkonzentration im untersuchten Bereich abhängig ist, oder daß eine größere Menge intrazellulären Nicht-Haemeisens für die Haemsynthese zur Verfügung steht.

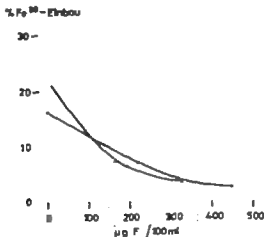


Abb. 4. Fe^{59} -Einbau in das Haem im gleichen Hämolyt unter Zusatz verschiedener Eisenmengen. Die Ansätze enthielten 5×10^{-4} mol Protoporphyrin.

Diskussion

Verwendet man radioaktives Eisen zur Bestimmung der Haemsynthese *in vitro* so ist es notwendig, nach der Inkubation das Haemisen von dem übrigen im Ansatz verbliebenen Radioeisen zu isolieren. Da die mehrmalige Kristallisation des Haems nach der Methode von FISCHER relativ umständlich und zeitraubend ist, führten wir Versuche mit der von MYHRZ (18) angegebenen Präzipitationsmethode durch, die einen wesentlich geringeren Zeitaufwand als die Kristallisationsmethoden erfordert. Man muß sich darüber im klaren sein, daß dabei nicht die Haem sondern die Hämoglobin-Eisen-Fraktion abgetrennt wird nach den Untersuchungen von KRAH UND BORSOOK (11) sowie SCHWARTZ *et al.* (21) geht die Haembildung jedoch gleichzeitig mit der Bindung des Protophyrins an das Globin vor sich unter Umständen wird das

Eisen sogar in den Globin Protoporphyrinkomplex eingebaut, so daß die molare Haembildung mit der Hämoglobinbildung unter diesen Bedingungen gleichzusetzen ist. Bei der einfachen Trichloroessigsäurepräzipitation wie sie z. B. von MALAMOS *et al.* (14) bei Inkubationsversuchen mit Thalassemieblut verwendet worden ist, wird nicht nur das Hämoglobineisen, sondern das gesamte erweißgebundene Eisen erfaßt es ist also notwendig vor der Erweißfällung das Nicht Haemeisen aus der Proteinbindung freizusetzen. Es handelt sich dabei vor allem um Ferritin, Hämosiderin, Transferrin und wahrscheinlich auch um nicht näher zu definierende Stromaeiweiße. Aus Ferritin und Hämosiderin wird das Eisen durch reduzierende Substanzen bei pH 4–4,8 freigesetzt (6) die Transferrinbindung wird durch HCl in genügend hoher Konzentration gespalten (12). Auch die z. B. von ALLEN und JANDL (1) nachgewiesene Bindung an Stromaeiweiße wird anscheinend bei der beschriebenen Vorbehandlung mit Acetatspuffer Natriumdithionit und Salzsäure gelöst. Wir fanden bei vergleichender Präzipitation aus dem Gesamthämolyat und dem daraus gewonnenen stroma-freien Überstand ebenso wie MYRRE (18) denselben Anteil des Radioeisens im Präzipitat. Der Anteil des nach Waschung im Präzipitat verbleibenden freien Eisens ist mit 0,1–0,5 % der zugesetzten Menge gegenüber den in unseren Untersuchungen beobachteten Einbauwerten so gering, daß er vernachlässigt werden kann. Ebenso wie MYRRE fanden wir bei Verarbeitung einer Fe^{59} Hämoglobininlösung 97 % der Gesamtaktivität im Präzipitat wieder so daß der Verlust bei der Isolierung sicher unter 3 % liegt. Bei der Bestimmung des Haem bzw. Hämoglobinradioeisenanteils verschiedener Ansätze nach Kristallisation oder nach Präzipitation lag eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden vor (Abb. 1). Die beobachteten Abweichungen gehen kaum über die Differenzen bei Doppelbestimmungen mit der Kristallisationsmethode hinaus und sind am ehesten der Fehlerbreite dieser Technik zur Last zu legen. Diese Übereinstimmung spricht unter anderem für die Richtigkeit der oben erwähnten Annahme, daß die molare Haem- und Hämoglobinbildung *in vitro* gleich ist, falls nicht gereinigte Haemsynthetasepräparate, sondern Zellen bzw. Vollhämolyat aus Erythrozyten verwendet werden. MYRRE fand eine befriedigende Übereinstimmung bei vergleichender Anwendung der Präzipitation und der elektrophoretischen Isolierung des Hämoglobins. Bei der von uns verwendeten Technik kann die Messung der Ge-

samtradioaktivität im Hämolyzat, die Präzipitation und Waschung sowie die anschließende Messung des im Hämoglobin enthaltenen Radioeisens im selben Probenröhrchen vorgenommen werden, so daß Pipettenfehler beim Abmessen der zu verarbeitenden Menge entfallen. Die Abweichung bei Doppelbestimmungen des hämoglobingebundenen Eisenanteils im selben Hämolyzat war mit durchschnittlich 2,1% gering, wenn die Radioaktivitätsmessung selber mit einem entsprechend geringen statistischen Fehler möglich war. Nach unseren Erfahrungen ist also die von MYRER angegebene, einfache und zeitsparende Präzipitationsmethode zur Bestimmung des im Hämoglobin enthaltenen Radioeisenanteils genau so gut geeignet wie die früher verwendeten, zeitlich wesentlich aufwendigeren präparativen Methoden.

Seit den ersten Radioeisenuntersuchungen von WALSH *et al.* (25) ist bekannt, daß Retikulozyten die Fähigkeit der Erythroblasten zur Hämoglobinsynthese zu einem geringen Teil bewahrt haben und daß diese Hämoglobinsynthese auch *in vitro* nachweisbar ist. GOLDNER *et al.* (5) konnten an Vogelerithrozyten zeigen, daß es sich bei dem letzten Schritt der Hämsynthese, der Verbindung von Protoporphyrin und Eisen, um einen enzymatischen Vorgang handelt. Die enzymatische Natur der Haembildung wird unter anderem dadurch gewiesen, daß sich der Eiseneinbau durch Zusatz von Kaliumcyanid oder Erhitzen des Ansatzes fast vollständig hemmen läßt, was auch bei unseren Kontrollversuchen der Fall war. Ebenso wie in ähnlichen an Vogelerithrozyten durchgeführten Experimenten (5, 21) fanden wir einen linearen zeitlichen Verlauf der Haembildung in den ersten 30 Minuten der Inkubation; nach 4 Stunden war nur noch eine geringe zusätzliche Reaktion zu beobachten. Reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure und Cystein (3) führten auch an Retikulozyten zu einer geringen Steigerung des Eiseneinbaus.

Die direkte Berechnung der tatsächlich neu gebildeten Haembzw. Hämoglobinmoleküle ist mit der Radioeisenmethode nicht möglich, da die Zellen selber einen gewissen Vorrat verwendungsfähigen Eisens enthalten, der meßtechnisch nicht zu erfassen ist. Die effektive spezifische Radioaktivität des für die Hämsynthese eingesetzten Radioeisens ist also nicht bekannt. Auf die Existenz eines solchen Eisenvorrats weisen unsere Versuche mit verschiedenen Trägerisotopenkonzentrationen hin, bei der die Abnahme der relativen Inkorporationsrate der zugesetzten Gesamteisenmenge

nicht proportional war. Ähnliche Befunde haben LOCHHEAD *et al.* (13) an Erythroblasten erhoben. BAKKERMANN *et al.* (2) VAVRA *et al.* (24) sowie LAJEAN *et al.* (19) konnten die Bedeutung des intrazellulären Pools von utilisierbarem Eisen in vergleichenden Versuchen mit C^{54} -markierten Porphyrinvorstufen und Fe^{59} beweisen. Für vergleichende Untersuchungen an denselben Zellen, wie sie hier durchgeführt wurden, spielt aber der Verdünnungsfaktor durch das zelleigene Vorratseisen keine Rolle.

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Fe^{59} -Hämoglobinebildung der Retikulozyten wurden meist an Suspensionen intakter Zellen durchgeführt, im Gegensatz zu den Versuchen von GOLDBERG *et al.*, die mit hämolysierten Vogelerithrozyten gearbeitet haben. Bei Untersuchungen an Suspensionen und Hämolysaten der gleichen Kaninchenretikulozyten konnten wir feststellen, daß unter sonst identischen Versuchsbedingungen die Hämoglobinbildung in der Suspension um ein Vielfaches höher lag als im Hämolysat. Durch Zusatz von δ -ALA und Protoporphyrin ließ sich die Hämoglobinbildung im Hämolysat wesentlich steigern, wenn sie auch die in der Suspension gemessenen Werte nicht ganz erreichte. Die optimalen Substratkonzentrationen lagen mit etwa 5×10^{-3} mol (s. Abb. 2) ebenso wie bei den Versuchen von GOLDBERG *et al.* (5) sowie VAVRA *et al.* (24) um ein Vielfaches über der physiologischen Substratkonzentration, die in retikulozytenreichem Kaninchenblut etwa 3×10^{-6} mol/100 ml Erythrozyten (δ -ALA) bzw. 5×10^{-7} mol/100 ml Erythrozyten (Protoporphyrin) beträgt. Dagegen konnte durch Glycin in Konzentrationen bis zu 1×10^{-3} mol die Hämoglobinebildung im Hämolysat nicht restauriert werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem von GOLDBERG entspricht aber gleichartigen Beobachtungen von SCHWARTZ *et al.* (21) an Vogelerithrozytenhämolysaten sowie von MAZUR und CARLTON (16) an Hämolysaten von Kaninchenretikulozyten. Die letztgenannten Autoren konnten ebenfalls eine erhebliche Beeinträchtigung des Eiseneinbaues durch Lyse der Zellen feststellen. Bei menschlichen Retikulozyten sind nach den Angaben von VAVRA die Unterschiede zwischen Suspension und Hämolysat wesentlich geringer als bei unseren Kaninchenversuchen.

Wie läßt sich die Abnahme des Radioeisenbaus durch die Hämolyse erklären? Verschiedene Möglichkeiten müssen diskutiert werden. Eine Vermehrung des zelleigenen utilisierbaren Eisens oder

eine Bindung des zugesetzten Radioeisens in der Weise, daß es nicht mehr voll für die Haemsynthese zur Verfügung steht, ist als Ursache der Hemmung unwahrscheinlich, da Protoporphyrinzusatz die Haembildung weitgehend wieder herstellt, während reduzierende Substanzen allein oder mit Glycin keine Wirkung haben. Wenn ein vermindertes Angebot von Protoporphyrin allein für die Senkung der Haembildung im Hämolyzat verantwortlich ist, muß der Aufbau der δ -ALA aus Glycin und Bernsteinsäure gestört sein, da δ -ALA die Haembildung im Hämolyzat fast ebenso stark stimuliert wie Protoporphyrin. Die Untersuchungen von HENLMAYER UND CLOTTEN (7) haben gezeigt, daß die Porphyrinsynthese mit δ -ALA im Hämolyzat ungestört abläuft und nicht als begrenzendende Reaktion der Haem- bzw. Protoporphyrinsynthese anzusehen ist. Es ist kaum vorstellbar, daß in den intakten Zellen auch nur annähernd soviel δ -ALA nachgebildet wurde, wie wir zur optimalen Stimulation im Hämolyzat zusetzen müssen; eigene Inkubationsversuche mit Zusatz von Glycin und Bestimmung der δ -ALA und des Porphobilinogen haben auch keine großen Unterschiede zwischen Hämolyzaten und Suspensionen gezeigt. Eine Störung der δ -ALA-Synthese kann also die beobachteten Unterschiede allein nicht befriedigend erklären. Man muß daher annehmen, daß tatsächlich der letzte enzymatische Schritt der Haembildung, d. h. der Einbau des Eisens in das Protoporphyrin durch die Zerstörung der Zellstruktur beeinträchtigt wird. Durch Steigerung der Substratkonzentration auf unphysiologisch hohe Werte kann der Prozeß der Haembildung im Hämolyzat wieder beschleunigt werden, die in den ganzen Zellen gemessenen Werte wurden bei uns aber auch bei optimaler Substratkonzentration nicht mehr erreicht. Ob die δ -ALA Bildung aus Glycin zusätzlich durch Hämolyse beeinträchtigt wird, kann aus unseren Versuchen nicht entschieden werden, sie reicht jedenfalls auch bei hoher Glycinkonzentration nicht aus, um die unphysiologisch hohe Porphyrinkonzentration zu erreichen, die zur vollen Ausnutzung der noch vorhandenen Restaktivität im Hämolyzat notwendig ist. Die Hemmung des Eiseneinbaues in das Protoporphyrin hängt am ehesten damit zusammen, daß die Haemsynthetase, im Gegensatz zu den löslichen Enzymen der Porphyrinsynthese, in der unlöslichen Zellfraktion, wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisiert ist (5, 21) und die notwendigen intrazellulären Transportvorgänge nach Hämolyse nicht mehr optimal ablaufen können.

Wie aus Abb 3 und Tabelle I hervorgeht, fand sich bei einzelnen Versuchen ein überraschend hoher Eiseneinbau auch im Hämolyzat ohne Substratzusatz. Es handelt sich ausnahmslos um Blutproben von Versuchstieren, bei denen mehrmals in kurzen Zeitaltständen größere Blutmengen entnommen worden waren und die meist eine besonders starke Retikulozytose mit vorherrschend junger Retikulozytenformen aufwiesen. Über spezielle Untersuchungen an solchen besonders aktiven Retikulozytenproben wird in einer späteren Veröffentlichung berichtet werden.

Zusammenfassung

Die Hämoglobinebildung in Kanincheneretikulozyten *in vivo* wurde mit Hilfe des Radioeiseinbaus untersucht. Mit der von Mynus angegebenen Präzipitationsmethode läßt sich die Auftrennung von Hämoeisen und Nicht-Hämoeisen im Ansatz relativ rasch und einfach durchführen. Vergleichsuntersuchungen mit der Haemkristallisation nach Fäcotte ergaben eine gute Übereinstimmung der Resultate. Die ^{59}Fe -Hämoglobinebildung wird durch Lyse der Zellen erheblich vermindert und durch Zusatz der Substrate δ -ALA oder Protoporphyrin nur teilweise wieder hergestellt. Durch die Zerstörung der Zellstruktur wird vorwiegend der letzte Schritt der Hämsynthese, nämlich der Einbau des Eisens in das Protoporphyrin bzw. den Protoporphyrin-Globin-Komplex beeinträchtigt. Bei Hämoglobinversuchen in Retikulozytenhämolyzaten wird eine Restaktivität der Hämoglobinbildung bei unphysiologisch hoher Substratkonzentration festgestellt.

Summary

Haemoglobin formation in rabbit erythrocytes was studied *in vivo* by measuring the incorporation of radioactive iron. Haem and non-haem iron can be distinguished relatively rapidly and simply by Mynus's precipitation method. Comparison with the results of Fäcotte's haem crystallization method showed good agreement. Formation of ^{59}Fe labelled-haemoglobin is considerably reduced by cell lysis and only partially restored by the addition of the substrates δ -ALA or protoporphyrin. Cellular destruction impairs particularly the last stage of haem synthesis, viz. the incorporation of iron into protoporphyrin or the protoporphyrin-globin complex. Residual haem activity is investigated experimentally in reticulocyte haemolysates with an unphysiologically high concentration of substrate.

Résumé

La formation de l'hémoglobine dans les réticulocytes du lapin a été étudiée à l'aide de l'incorporation de fer radio-actif *in vivo*. La méthode de précipitation indiquée par Mynus permet une séparation relativement rapide et simple du fer contenu et non contenu dans l'hème. La méthode de cristallisation de l'hème d'après Fäcotte donne des résultats correspondant bien. La formation d'hémoglobine radio-marquée au ^{59}Fe est fortement diminuée par la lyse des cellules et n'est que partiellement rétablie par l'adjonction de delta-ALA ou de protoporphyrine. C'est avant tout le dernier pas de la synthèse de l'hème, celui de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine respectivement dans le complexe protoporphyrine-globine, qui est atteint par la destruction des structures cellulaires. Lors d'essais de synthèse dans des hémolyzats de réticulocytes, nous avons trouvé un reste de formation d'hème en présence de concentrations anormalement fortes de substrat.

Literatur

1. ALLEY, D. W. AND JARON, J. H. Kinetics of intracellular iron in rabbit reticulocytes. *Blood* 15: 71 (1960)
2. BARTERMAN, R. M.; GRINSTEIN, M. AND MOORE, C. V. Haemoglobin synthesis in thalassemia; *in vitro* studies. *Brit. J. Haemat.* 5: 102 (1959)
3. BRACKO, L. AND LAZZARINI, E. Incorporation rates of 2- C^{14} -glycine into globins and haem by duck red cells incubated *in vitro* with plasma or saline. *Nature* 195: 441 (1962).
4. GAJDOS TÓRÖK, M.; GAJDOS, A. ET BERNARD, H. Etude par le fer radioactif de l'enzyme catalysant la biosynthèse de l'hème. *Sang* 30: 459 (1959).
5. GOLDBERG, A. H.; AGRESTONBUCHER, G. E., CARTWRIGHT AND WINTROBE, M. M. Studies on the biosynthesis of haem *in vitro* by avian erythrocytes. *Blood* 11: 821 (1956)
6. GRACE, E. Structure and physiological functions of ferritin. *Physiol. Rev.* 31: 489 (1951)
7. HELLMAYER, L. Die Störungen der Hämoglobinsynthese (Thieme, Stuttgart 1964)
8. KAMBEAAR, A., MORELL, H. AND LONDON, I. M. The incorporation of glycine into globin and the synthesis of haem *in vitro* in duck erythrocytes. *J. biol. Chem.* 229: 423 (1957).
9. KLEY, J. R. Protoporphyrin and haem formation by erythrocytes from the x-irradiated and bled duck. *Amer. J. Physiol.* 201: 663 (1961)
10. KLEY, J. Biosynthèse de l'hémoglobine par les systèmes acellulaires des réticulocytes. *Funk. Biol.* 10: 17 (1962).
11. KLEY, J. AND BOWEN, H. Haemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes *in vitro*. *J. biol. Chem.* 230: 905 (1956)
12. LATHILL, C. B. Studies on the transportation and metabolism of iron in the body. *Acta physiol. scand.* 14 suppl. 46 (1947).
13. LOCKHEAD, A. C.; KRAMER, S. AND GOLDBERG, A. Quantitative measurement of the iron incorporating enzyme in relation to marrow cells and liver tissue in the rabbit. *Brit. J. Haemat.* 9: 99 (1963)
14. MALANOS, B.; OTTYLAKI, E. AND PROURAS, Ch. Uptake of Fe^{59} by acid insoluble elements of normal and thalassemic hemopoiesis. *In vitro* studies. *Acta haemat.* 21: 79 (1964)
15. MALANOWSKA, A.; DANCOWICZ, A. M. UND KOWALSKI, E. Hemmung der Inkorporation von Eisen in Protoporphyrin durch Plasma. *Folia haemat. (Lpz.)* 78: 414 (1962).
16. MARIN, A. AND CARSTEN, A. Relation of ferritin iron to haem synthesis in marrow and reticulocytes. *J. biol. Chem.* 238: 1817 (1963)
17. MORELL, H.; BAYON, J. C. AND LONDON, I. M. The biosynthesis of haem and the incorporation of glycine into rabbit bone marrow *in vitro*. *J. biol. Chem.* 233: 923 (1958).
18. MYRNE, E. Iron uptake and hemoglobin synthesis by human erythroid cells *in vitro*. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 15: 212 (1964).
19. NAYAN, Y.; ARDAILLO, N. ET MULLMAN, M. Etude des compartiments non hémologiques du fer. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* 4: 31 (1964)
20. POWERS, E. R. AND BERMAN, L. Correlation of radioactive haem formation with morphologic alterations in cultures of human bone marrow. *Blood* 14: 777 (1957)

21. SCHWARTZ, H. C. CARTWRIGHT G. E.; SMITH, E. L. AND WINTROBE, M. M.: Studies on the biosynthesis of heme from iron and protoporphyrin. *Blood* 14: 486 (1959).
22. SHEDDEN, D. LONDON, I. M. AND RITTMANN, D.: The synthesis of protoporphyrin *in vitro* by the red blood cells of the duck. *J. biol. Chem.* 193: 757 (1950).
23. THOMAS, E. D.: *In vitro* studies of erythropoiesis. I. The effect of normal serum on heme synthesis and oxygen consumption by bone marrow. *Blood* 14: 600 (1953).
24. VAVRA, J. D.; KUCEROFF, V. MAVER AND MOORE, C. V.: *In vitro* heme synthesis by human blood. Abnormal heme synthesis in thalassemia major. *J. Lab. clin. Med.* 63: 736 (1964).
25. WALKER, R. J. THOMAS, E. D. CHOW S. K. FLEMING, R. G. AND FINE, C. A.: Iron metabolism. Heme synthesis *in vitro* by immature erythrocytes. *Science* 114: 396 (1949).

Address der Autoren: Dr. H. Helmpel, Dr. R. Clotten und Dr. L. Hellmeyer Med. Univ.-Klinik, Bismarck-Strasse 33, 78 Freiburg im Br. (Deutschland).

Fundacion Hematologica de Mar Del Plata

Substitutive Inhibitory Gamma Globulin Therapy as Prevention of Stillbirth in Rh Incompatibility

By E. REWALD AND F. SURINGAR

The exact regulation of γ -globulin metabolism is not known. According to the idea of replacing pathological factors by normal (i.e. substitutive inhibitory treatment in constitutional non-spherocytic disease) (1) massive doses of human γ -globulin were injected to a pregnant woman sensitized against Rh of fetal red cells. Up to a certain extent, mother and fetus form a unit and the development of this incompatibility may be considered pathological. Our target is to inhibit at least partially the antibody production in order to avoid stillbirth.

Case Report

M.V. pregnant woman aged 27 years was admitted near the eight month when anti-D antibodies were detected.

Past history: At the age of 20 years she gave still-birth by cesarean. On this occasion the received blood unit of compatible blood from her brother (d/d). At the age of 3 her son Luis was born. In the cord blood the direct antiglobulin test was strongly positive and exchange transfusion was performed at 36 hours of life. Her bilirubin level reached 28.6 mg%. After this, splenomegaly and jaundice disappeared progressively remaining the child without sequelae.

On admission (February 12) the pregnant patient seemed to be healthy. The antibody titre of serum incubated with the iso-group erythrocytes of the husband determined by Coombs technique were 1/8. One month ago the indirect Coombs test was negative. The γ -globulin treatment was started by via intramuscular during the first two days and continued intravenously at increasing doses up to 13 g daily until reaching 72 g (February 26). Afterwards she received reinforcement doses of 6.4 g on alternative days reaching total amount of 103.32 g. The pooled human γ -globulin was diluted 1:1% in saline and injected by intravenous slow dropping. In our patient no side effects were observed. During this period the antibody concentration remained nearly constant, but one month after delivery the titre rose suddenly from 1/8 up to 1/32. The anti-B titre was 1/64 and diminished after delivery slightly to 1/32. The whole family has blood group A.

The delivery of the boy weighing 3.1 kg was spontaneous and normal. In the cord blood the direct antiglobulin test was clearly positive, inheriting the child the D-factor from his father. Nevertheless we could not observe any clinical symptom related with erythroblastosis. The bilirubin level increased only up to 1.5 mg-% and during the first month of life no anaemia developed, neither increasing of reticulocytes. Spleen was not palpable and the size of the liver remained normal.

If first affected infants are excluded, the rate of intrauterine death amongst Rh-positive fetuses carried by mothers whose serum contains anti Rh is about 29% (2). Although the disease tends to be more severe in subsequent siblings, occasionally mild disease may follow stillbirths due to Rh incompatibility a fact which should make one cautious in interpreting apparent successes in the treatment of pregnant women with a 'bad history'. Our single clinical observation induces us to look for an experimental basis.

Methods

Female albino rats fed with Fortamex and water ad libitum were housed in individual cages at 21-23 °C. Half of each litter was placed one day after birth in the experimental group and the remaining rats served as controls. In order to guarantee normal growth the maximum number per litter was 8. Volume and frequency of intraperitoneal injections were identical in all cases. Serum was collected from adult rats, mostly male as pure homologous γ -globulin was not available.

Homologous serum. daily injections in order to obtain high γ -globulinemia during the first week. Further injections were equal to 1.6% of body weight plus 100% of the daily weight increase.

Controls. Equivalent volume of saline injections.

At the age of three weeks both groups were sensitized with sheep erythrocytes (washed and resuspended) via intraperitoneal. These were given on alternative days, always at least three hours after the daily injection. Three foldal doses of 0.1 ml and two of 0.1 ml. Two days after the fifth sensitizing injection the induced antibody titre was determined (table 1). Since then, injections were interrupted and in some cases the antibody titre was repeated seven days later.

Other litters received the injections one day before starting the sensitization with sheep-erythrocytes. In order to boost the γ -globulin content in the experimental group, an additional amount equal to 10% of body weight was injected during the first three days. These animals were compared to other litters where similar injections were applied during the last five days of the experiment, that is to say five days after sensitization against sheep-erythrocytes was started.

Agglutination was read after incubation during three hours at room temperature and further maintenance at 4 °C until the next morning. Body weight, protein and γ -globulin level in serum, as well as hematocrit were determined. Histological examination and weight of thymus and spleen were performed, as well as histological protocol of liver and kidney.

¹ Chem. analysis. protein 17%, fat 4.6%, carbon hydrate 56%, minerals 6%, calcium 1%, phosphorus 1%, vit. A, D, B₁, B₂, B₆, B₁₂, choline nitrate, Ca-pantothenate, vit. K₁, E, etc. raw fibre max. 3.8%.

ml% of body weight, day 1 4% 2: 4.23% 3 4.46% 4 4.69% 5 4.97%
6: 5.15%, 7 5.38%

ections were started during the immunological tolerance period in order to possible incompatibility against γ -globulin. Coincidence of starting sensitization obelin therapy is more similar to the clinical condition.

Results

each of the 9 litters on which homologous serum was administered before sensitization with sheep-erythrocytes was started, average agglutinin titre of the experimental animals was lower than that of their controls. The excellent tolerance without significant mortality and absence of noticeable differences in other aspects (including γ -globulin levels) between both groups, support that the serum injections per se have no interfering influence on the course of the experiment. Other evidences are given by a) absence of differences in antibody titre, if serum injections were given only during the last five days of the experiment, b) constancy of antibody titre one week after interruption of the treatment.

Independently Dr. ROSS PROVANSKY (3) made similar observations with C₃H B/a mice (inbred). These animals were injected with homologous serum every other day per via intraperitoneal in increasing doses from 0.3 ml up to 1.2 ml during 15 days totalizing and subsequently with 0.2 ml packed sheep erythrocytes. The average agglutinin titre of the pooled serum was 1/8 (weekly) while the titre of the control group rose up to 1/64 (strongly)

Table I
Anti-sheep erythrocyte agglutinin titre.

a) Rats injected with homologous serum (20 animals) b) Controls (34 animals)

Titre ^a	(20 rats of exp. group)	b) (34 rats of control)
1/16	40%	100 %
1/32	20%	85.3%
1/64	20%	58.8%
1/128	10%	44.2%
1/256	5%	20.6%
1/512	—	5.9%
A. Tk.	1/9 (± 0.27 tub)	1/78 (± 0.17 tub)
Probability $+ II$	0.999	

^a includes only rats injected since birth. 8 rats, where serum injections were started before sensitization, the difference to controls was equivalent. meantime 4 rats received serum five days after sensitization with sheep-erythrocytes was started, no diminution of the agglutinin titre. As serum was not inactivated, lower agglutinin-titres were interfered by natural erythrocyte hemolysis.

In adults plasma normally contains about 1 g γ -globulin per 100 ml (2). This level is approximately the same to that of a great variety of mammals (4). Even during severe undernutrition the antibody forming system maintains its efficiency almost normal (5). Furthermore, in absence of pathological conditions the electrophoretic pattern of geriatric subjects (over age 60) are in the same range as that of the younger group.

It has been shown that γ -globulin synthesis depends largely on antigen stimulus. In germ-free animals the concentration of γ -globulin was found very much below the normal level. This state of hypo- γ -globulinaemia gradually disappears when these animals are exposed to the usual microbiological flora (6, 7). On the other hand hyperimmunization and certain pathological conditions may multiply the γ -globulin content.

Nevertheless the constancy of γ -globulin level is difficult to explain without accepting an appropriate regulative mechanism relatively independent of the numerous specific antibody properties. The exposure to antigens is indeed extremely variable, depending on many geographical, climatic and alimentary conditions, as well as the density of population.

If this hypothesis is true, it might be possible to obtain an inhibitory level by massive administration of homologous pooled γ -globulin. Avoidance of stillbirth due to Rh incompatibility seems to be an appropriate self-limited clinical target. Complete disappearance of antibodies is not necessary; it merely has to be prevented that the boost of anti-Rh titre reaches a dangerous level when 7S- γ -globulins are able to cross massively into the fetus.

Anti Rh can cross the placenta at a very early stage of pregnancy. Nevertheless there is very little quantitative evidence about the passage of γ -globulin at this time (8). The γ -globulin concentration was found very low in fetuses of 3 to 4 months. MARTIN (9) found virtually no γ -globulin at or before the twenty-sixth week. Progressively the γ -globulin concentration increases steadily towards term, being low in premature infants and reaching a similar level to the mother's shortly before delivery.

Incompatibility means capability of fetal red cell destruction. Therefore a relatively high amount of antibodies is required. The delay in crossing the placental barrier the survival of many coated

red cells and the fast renewal of the destroyed red cells are factors which protect fetal life.

Our experimental results reveal a significant diminution of sensitization, encouraging to further investigation. 'Substitutive inhibitory' γ -globulin therapy (10) has to be started as early as possible when incompatibility has been detected. The prolonged life span of 7S globulins do not permit a fast reduction of the titre, and it is doubtful that antibody synthesis can be interrupted completely.

Large amounts of γ -globulin up to several times the total body content have been administered in plasma or blood transfusions (i.e. extent burns, haemorrhages) and no information is available about special intolerance to γ -globulin in these cases. Approximately half of intravenous injected γ -globulin disappears from the blood within 24 hours (5). This first phase represents equilibration with extravascular γ -globulin. Thereafter there is a steady decline which follows an exponential curve with a half time of about 21 to 26 days. With our preparation only 7 S γ -globulin is given in effective doses. Sensitization to homologous γ -globulin antigens may be a cause of ineffectiveness of γ -globulin treatment owing to accelerated removal from the circulation. Methods for easy detection are required, specially when γ -globulin therapy is very prolonged or exists the antecedent of previous blood transfusions.

Acknowledgements: We wish to thank Miss CELIA PELLITTERO for her conscientious technical assistance and to the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Soc. Salazar for the regularity and excellent condition of sheep blood delivery.

Summary

A pregnant anti-Rh sensitized woman with 'bad history' was treated with massive doses of γ -globulin. Subsequently there was no increase of the antibody-titre until one month after delivery of Rh-positive healthy boy. These results are parallel to the diminution of anti-sheep red cell agglutinin production in rats (and mice) injected regularly with high quantities of homologous serum. Therefore substitutive-inhibitory γ -globulin treatment seems to be useful in preventing stillbirth due to maternal-fetal blood incompatibility.

Zusammenfassung

Eine schwangere, Rh-sensibilisierte Frau, deren letztes Kind eine schwere Erythroblastose durchmachte, wurde mit hohen Dosen γ -Globulin behandelt. Die Antikörpertiter blieb unverändert und erhöhte sich erst einen Monat nach der Geburt eines gesunden Rh-positiven Jungen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Verminderung von anti-Schaf-Erythrocyten-Agglutininen bei Ratten (und Mäusen) überein, die während der Sensibilisierung mit großen Mengen homologen Serum gespritzt wurden. Aus diesem Grunde scheint die substitutiv-inhibitorische γ -Globulin-Behandlung nützlich zur Verhütung der Totgeburt durch Blutunverträglichkeit zu sein.

Résumé

Une femme enceinte, sensibilisée contre le facteur Rh, dont le dernier enfant avait souffert d'une grave érythroblastose, fut soignée à hautes doses de γ -globulin. La concentration des anticorps resta inchangée, mais s'accrut un mois après la naissance. Ce résultat accorde avec la diminution d'agglutinines anti-érythrocytaires de mouton chez des rats et des souris à qui on avait injecté d sérum homologue en grandes quantités pendant la sensibilisation. C'est pour cette raison que le traitement substitutif-inhibiteur à la γ -globuline semble être utile pour prévenir la mort fœtale due à l'incompatibilité sanguine.

References

1. RAWALD, E. Substitutive-inhibitory therapy in constitutional non spherocytic erythrocytic disease. *Acta haemat.* 31: 303 (1964).
2. MOLLISON, H. L. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, p. 42, 605 (Blackwell, Oxford 1961).
3. PIROVSKY, ROSA R. DE. *Peru. Inform.*
4. ALTMAN, P. *Blood and other Body Fluids. Biological Handbooks*, Fed. Amer. Soc. exp. Biol.
5. HENNINGSEN, J. AND WHITE, R. *Immunology for Students of Medicine*, 2nd ed., p. 116 (Blackwell, Oxford 1964).
6. GUSTAFSSON, B. AND LATHALL, C. γ -globulin production in germ-free rats after bacterial contamination. *J. exp. Med.* 110: 675 (1959).
7. WESTMARK, B. AND GOSPOD, H. Electrophoretic studies on the serum protein pattern of the germ-free rat and its changes upon exposure to conventional bacterial flora. *J. Immunol.* 84: 27 (1960).
8. MOORE, D.; DUPAN, M. AND BURTON, C. An electrophoretic study of maternal, fetal and infant sera. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 57: 312 (1949).
9. MARTIN, N. A γ -globulinaemia - congenital defect. *Lancet* ii: 1094 (1954).
10. LEVI, S. ET MAYER, M. Essai d'inhibition de la formation d'anticorps par substitution de γ -globulines. *Presse méd.* (Paris) 69: 105 (1961).

Authors' address: Dr. E. Rawald, Corrientes 2330, *Mar del Plata* (Argentina).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik des Kantonspitals Zürich
(Direktor Prof. P. H. Romsdahl)

Eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorase mangels*

Von P. G. FRICK, F. BACHMANN UND J. R. SCHMID

Kongenitale Methämoglobinämien werden pathogenetisch in zwei Gruppen eingeteilt. Bei der ersten Gruppe ist die fermentative Rückreduktion von Methämoglobin beeinträchtigt, bei der zweiten ist die Struktur des Hämoglobins abnorm. Bis heute ist nur eine einzige fermentative Störung bekannt geworden, die zur spontanen Methämoglobinämie führt der Diaphorase mangel. Hingegen sind in neuerer Zeit mehrere abnorme Hämoglobine entdeckt worden, deren gemeinsames Charakteristikum Methämoglobinämie ist. Diese Hämoglobine bezeichnet man als Hb M (5 19-21 25 28, 36, 41 44).

Im folgenden wird über Untersuchungen einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorase mangels berichtet.**

Methoden

Das Methämoglobin (Met-Hb) wurde bestimmt nach der Methode von EVELYN und MALLOW (17) mit einem Coleman-Spektrophotometer. Nach Zusatz von KCN wurde die Aufhellung bei 630 m μ gemessen. Für die Untersuchung der beiden physiologischen Mechanismen der *Methämoglobin-Abbildung* wurde das Hämoglobin zuerst durch Behandlung mit Natriumoxalat in einem NaCl-Phosphat-Puffer (pH 7,3) nach der Methode von BERKE (4) praktisch vollständig in Methämoglobin umgewandelt. Anschließend werden 3 ml der gewaschenen Erythrozyten in isotonischer NaCl-Phosphat Lösung bei 57 °C aufgeschwemmt. Aus dieser Suspension wurde eine Versuchserhebe angefertigt mit 5% Glukose, 3% Glukose + Methylblau, 5% Natriumoxalat und 5%

Diese Untersuchung wurde dank der Unterstützung der Bendos-Stiftung zur Förderung der Medizinisch-biologischen Wissenschaft ermöglicht.

Herrn Dr. H. FELLMANN, Luzern, und Herrn PD Dr. F. SCHMID sei für die Überweisung des Patienten F. H., welche zur eingehenden Abklärung der Sippschaft führte, bestens gedankt.

Laktat + Methylengrün. Die Ansätze mit Glukose dienen der Untersuchung der aeroben, TPNH-abhängigen Met-Hb-Rückbildung über den Hexosemonophosphatweg (Abb. 1) derjenige mit Laktat der Untersuchung des anaeroben, DPNH-abhängigen Mechanismus (Abb. 2). Der Met-Hb-Gehalt wurde nach 1 1/2- und 4-stündiger Inkubation bestimmt. Die bei 10 Kontrollen ermittelten Normalwerte sind in Tab. I dargestellt.

Die Bestimmung der *Erythrocyten-Diaphorase* erfolgte nach der Methode von SCOTT (45). Die Bestimmung der *Glucose-6-PHosphat-Dehydrogenase* (= G-6-PD) wurde nach der Methode von KORNBERG *et al.* (29) durchgeführt. In einzelnen Fällen wurde ferner die *Glutathion-Stabilität* nach der Methode von BEUTLER (7) modifiziert nach ROSS (39) bestimmt.

Das *Absorptionsspektrum* des Blutfarbstoffs wurde vergleichend im Oxyhämolysat, Methämolysat und Cyanmethämolysat, gepuffert bei pH 5,3, 6,6 und 8,3 im Beckman-DU-Spektrophotometer aufgenommen.

Rezultate

Die Abklärung der seit Geburt bestehenden Cyanose der beiden Brüder F. H. (III/6) und F. E. (III/8) führte zur Feststellung einer Sippechaft mit kongenitaler *Methämoglobinämie* infolge *Diaphorase*-mangel (Abb. 3). Die Familienuntersuchung umfaßt 58 Mitglieder aus 4 Generationen, bei denen in 27 Fällen eine allgemeine hämatologische und eine eingehendere Untersuchung der Erythrocytenfermente ausgeführt wurde. In allen 27 Fällen wurden Bestimmungen von Met-Hb und Diaphorase vorgenommen, in 9 Fällen der Met-Hb-Rückreduktionstest nach BERES (4) in 11 Fällen die G-6-PD und in 4 Fällen die Glutathion-Stabilitätsbestimmung nach der Methode von BEUTLER (7). Bei Fall III/6 wurden ferner spektralanalytische Untersuchungen des Hämoglobins vorgenommen. Bei der Mutter (II/3) der cyanotischen Brüder sowie bei ihren vier direkten Nachkommen (III/4, 6, 8 und 9) und bei allen 14 Nachkommen zweiten Grades konnte durch die Bestimmung der Blutgruppe, die ohne Ausnahme A/Rh/positiv war, die Signifikanz der genealogischen Untersuchung bestätigt werden. Eine Blutsverwandtschaft konnte nicht ermittelt werden. Die weiteren Vorfahren (I/1-4) stammen aus vier verschiedenen Gemeinden der Inner- und Oberrheinischen Schweiz (Hasliberg, Kerns, Alpnach und Sarnen Wilen). Eine Blutsverwandtschaft von II/3 und II/4 ist somit unwahrscheinlich. Unter den Mitgliedern der Generationen I und II, welche bürgerliche Berufe ausübten und im allgemeinen ein höheres Alter erreichten, sind keine weiteren Fälle von Cyanose bekannt.

Der von verschiedenen Autoren festgestellte autosomale und rezessive Erbgang des Leidens wurde bestätigt. Die Familienmitglieder werden im folgenden entsprechend ihrer genetischen Einteilung besprochen.

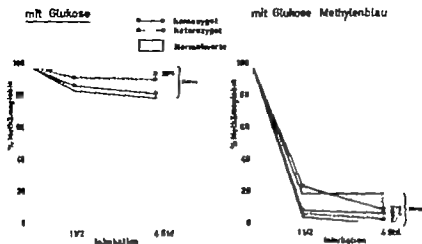


Abb. 1 Ergebnisse der Methämoglobin-Rückreduktion mit Glukose und Glukose + Methylenblau bei den homozygoten und heterozygoten Mitgliedern der Familie.

Methämoglobin - Rückreduktion

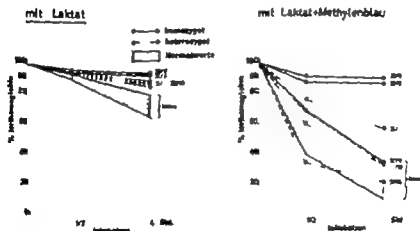


Abb. 2 Untersuchung des anaeroben, DPV-abhängigen Weges der Methämoglobin-Rückreduktion mit Laktat und Laktat + Methylenblau.

Homozygote Mitglieder

Fälle mit pathologisch erhöhtem Methämoglobingehalt und stark erniedrigter Erythrozyten Diaphorase sind homozygote Träger der Krankheit (42)

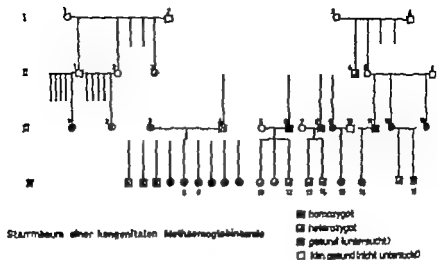


Abb. 3. Die untersuchte Sippechaft von homozygoten und heterozygoten Trägern der kongenitalen Methämoglobinämie.

Fall III/6 (F. H. ♂ geb. 1922): Der Patient war seit Geburt cyanotisch, ohne jedoch in seiner körperlichen Leistungsfähigkeit beeinträchtigt zu sein. Die 1961 durchgeführte Untersuchung ergab einen völlig normalen klinischen Status, mit Ausnahme der Cyanose. Herz und Lungen unauffällig, BD 130/80, Thoraxaufnahme und EKG o. B. Senkung 2 mm/Std., Hämoglobin 18,6 g%, aktives Hämoglobin 11,1 g%, inaktives Hämoglobin 7,5 g%, Gehalt an Methämoglobin 38,6% (spektrophotometrisch), Erythrozyten 5820000, Farbindex 1,0, Hämamkrit 5,5%, Retikulozyten 10%, beim Innenkörper Leukozyten 6600 mit normaler Verteilung, Thrombozyten 132000. Im Sternalmark leicht geringere Erythropoese. Die O_2 -Dissociationskurve war nach links verschoben (Abb. 4). Serum Eisen 125 μ g%, Bilirubin total 1,0 und direkt 0,1 mg%, osmotische Resistenz der Erythrozyten und Urinanalyse im Bereiche der Norm. Die Erythrozyten-Dehydrogenase mit 1,7 Δ OD/Min/mg Met-Hb war deutlich erniedrigt (normal 5,3–8,4). Untersuchungen auf ein abnormales Hämoglobin (Elektrophorese, Chromatographie, Alkali-Denaturierung) und Bestimmungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität fielen normal aus. Dagegen war beim Met-Hb-Rückreduktionstest die Rückbildung mit Laktat und Laktat + Methylenblau deutlich vermindert (Abb. 2). Das Absorptionsspektrum des Orythymolysates des Patienten wies eine Hebung bei 630–635 m μ auf (Abb. 5), die mit KCN vollständig aufgehoben wurde. Dieses Verhalten ist typisch für die kongenitale Form der Methämoglobinämie infolge Diaphorase-mangel.

Fall III/8 (F. E. ♂ geb. 1924): Seit Geburt ausgeprägte Cyanose, sonst früher Anamnese ohne Belang. Status, besonders Herz und Lungen o. B. Hämoglobin 18,1 g%, Hämamkrit 53%, Met-Hb 17,3% (spektrophotometrisch) und Erythrozyten-Dehydrogenase 1,6 Δ OD/Min/mg Met-Hb. Beim Met-Hb-Rückreduktionstest nur sehr geringe Rückbildung mit Laktat und Laktat + Methylenblau (Abb. 2), dagegen normale Werte mit Glukose (Abb. 1). Die Bestimmungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität waren im Bereiche der Norm.

Heterozygote Mitglieder

Fälle mit normalem Gehalt an Methämoglobin, jedoch einer Verminderung der Erythrocyten-Diaphorase in einem mittleren Bereich ($2,8-4,8 \Delta \text{OD}/\Delta \text{min}/\text{mg Met Hb}$) sind heterozygote Träger des Enzymdefektes (43). Es handelt sich um die direkten Vorfahren und Nachkommen sowie um zwei entferntere Verwandte der väterlichen Linie der beiden homozygoten Probanden (Abb. 3).

Fall III/3 (geb. 1886) Die Mutter der homozygoten Brüder ist gesund und nicht cyanotisch. Hämoglobin $14,4 \text{ g\%}$; Leukocytenzahl sowie Differentialbild und osmotische Resistenz der Erythrocyten normal. Met-Hb $1,45\%$. Die Diaphorase ist deutlich erniedrigt ($2,8 \Delta \text{OD}/\Delta \text{min}/\text{mg Met Hb}$). Bei der Met-Hb-Rückreduktion erfolgte ein nur geringer Abfall auf Zusatz von Laktat und Laktat + Methyleneblau, so daß die Werte in einen mittleren, noch pathologischen Bereich zu liegen kommen (Abb. 2). Untersuchungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität waren im Bereiche der Norm.

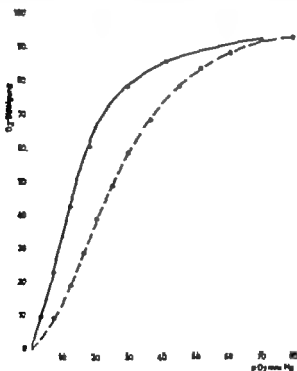


Abb. 4 Die O₂-Dissoziationskurve eines homozygoten Patienten mit kongenitaler Methämoglobinämie (Fall III/5) (—) verglichen mit einer gesunden Kontrollperson (o—o).

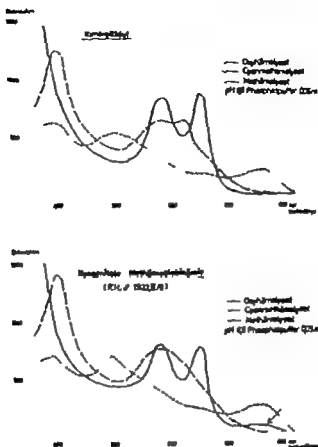


Abb. 5. Spektrophotometrische Messungen der Extinktion im Oxythemolysat, Cyanothemolysat und Methemolysat bei einem Kontrollblut und einem homozygoten Fall (Nr. III/6) von kongenitaler Methämoglobinämie. Bei der Methämoglobinämie liegt ein breites Absorptionsmaximum bei 630 m μ im Oxythemolysat vor, welches auf Zusatz von KCN verschwindet.

Fall II/4 (geb. 1877) Der Vater der erkrankten Geschwister kam bei 68. Lebensjahr an einem Herzinfarkt ad exitum. Er war nicht cyanotisch. Aus genealogischen Gründen muß er ein heterozygoter Träger gewesen sein. Eine Bestätigung dafür ist der Nachweis von zwei heterozygoten Nachkommen der entferntesten väterlichen Linie (III/11 und IV/17).

Fall III/12 (geb. 1912) Klinisch gesund, Met-Hb 0,57%, Diaphorase 4,6 Δ OD/ Δ min/mg Met-Hb.

Fall IV/10 (geb. 1945) Klinisch gesund, Hämoglobin 13,7 g%, Met-Hb 0,5% und Diaphorase 3,5 Δ OD/ Δ min/mg Met-Hb. Die Met-Hb-Rückreduktion mit Glukose und Laktat sowie die G-6-PD waren normal.

Fall IV/11 (geb. 1950) Klinisch gesund, Hämoglobin 14,4 g%, Met-Hb 0,5%, Diaphorase 4,1 Δ OD/ Δ min/mg Met-Hb, normale G-6-PD und Met-Hb-Rückreduktionen mit Glukose und Laktat.

Tabelle I

Ergebnisse der Methämoglobin- und Enzym-Bestimmungen der Sippechaft.

Lebentyp	Fall	Methämoglobin %	Diaphorase Δ OD/Min/mg Met-Hb	Methämoglobins Konzentration (nach Becke) Prozent reduziertes Methämoglobin nach Jakobsen						
				Glukose		Glukose und Mierofunktion		Laktat		
				1½ h	4 h	1½ h	4 h	1½ h	4 h	
mauerie	10 Fälle	1,0	5,3-8,4	85-100	80-100	5-20	0-20	90-95	65-80	41
ozygote	III/6	38,8	1,7	97	95	25	7,5	93,5	95	5
	III/8	17,3	1,6	88	83	9	9	95,5	94	6
	III/3	1,45	2,8	93,5	92	7,5	4	89,5	87,5	7
ozygote	III/12	0,57	4,6							
	IV/10	0,5	3,3	92	89,5	4,5	8,5	88	78,5	6
	IV/11	0,5	4,1	89	86	7	6	89	85	6
	IV/12	0,5	4,8							
	IV/13	0,99	3,9							
	IV/14	0,74	5,3					92,5	92	5
	IV/17	0,85	4,1							
male	III/1	0,82	6,4							
	III/2	0,73	5,3							
	III/4	1,02	5,4	94,5	93	12	7	84,5	71,5	4
	III/9	0,94	6,6					94,5	92	1
	III/11	1,02	5,0							
	III/13	1,02	5,3							
	IV/1	0,7	5,6							
	IV/2	0,7	7,3							
	IV/3	0,7	6,1							
	IV/4	0,5	6,9							
	IV/5	0,5	6,0							
	IV/6	0,5	6,6							
	IV/7	1,0	5,3							
	IV/8	0,6	6,0							
	IV/15	0,6	5,8							
	IV/16	0,71	6,2							
	IV/18	0,62	5,3							

Fall IV/12 (geb. 1956) Klinisch gesund, Hämoglobin 16,0 g%, Met-Hb 0,5%, Diaphorase 4,8 Δ OD/Min/mg Met-Hb.

Fall IV/13 (geb. 1957) Klinisch gesund, Met Hb 0,99%, Diaphorase 3,9 Δ OD/Min/mg Met-Hb.

Fall IV/14 (geb. 1961) Dieses Kind hatte wegen einer Anämie (Hämoglobin von 10,2 g%) Eisen per os erhalten. Anschließend, im Zeitpunkt der Untersuchung, waren Hämoglobin 13,4 g%, Erythrozyten 5,2 Mill., Farbindex 0,81 Retikulozyten 25%, Met-Hb 0,74% und Diaphorase 5,3 Δ OD/Min/mg Met Hb.

Fall IV/17 (geb. 1945) Klinisch gesund, Met-Hb 0,85%, Diaphorase 4,1 Δ OD/Min/mg Met Hb.

Gesunde Mitglieder

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, wurden bei 17 Mitgliedern der Sippe normale Werte für Methämoglobin und Erythrozyten Diaphorase gefunden. Die zwei Geschwister (III/4 und III/9) der cyanotischen Probanden und ihre sämtlichen Nachkommen (IV/1-9 und IV 15-16) waren keine Träger des Enzymdefektes.

Diskussion

Bei jedem Patienten mit einer seit frühester Kindheit bestehenden Cyanose ohne Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit muß die Verdachtsdiagnose einer kongenitalen Methämoglobinämie gestellt werden (32-33). Wie eingangs erwähnt, sind heute zwei pathogenetisch verschiedene Gruppen kongenitaler Methämoglobinämien bekannt: der einen liegt eine Fermentstörung zugrunde (8-10, 14-16, 18, 23, 33, 37, 42, 43, 45-47), der anderen abnorme Hämoglobine (sog. Hb M). Die Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangel ist schon bei der Geburt manifest. Der Enzymdefekt wird rezessiv, die bisher genetisch abgeklärten Hämoglobine M werden dominant vererbt. Die spektrometrische Trennung der beiden Methämoglobine ist relativ einfach. Das durch Diaphorasemangel bedingte Met Hb entspricht dem durch Oxydation von normalem Hämoglobin A erhältlichen Met Hb A. Es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 630 m μ , welches durch Zusatz von KCN verschwindet (18). Ascorbinsäure (2) und Methylenblau reduzieren Met Hb A, während Met Hb M nicht beeinflußt wird.

Die bei den cyanotischen Probanden (III/6 und III/8) ausgeführten Untersuchungen ergaben die für einen Diaphorasemangel typischen Befunde. Die Ursache des chronisch erhöhten Met Hb-Wertes ist die ungenügende Rückreduktion des konstant anfallenden Met Hb (40). Bei normaler Hämoglobin-Struktur wird dieser Prozeß durch die intraerythrozytäre Glykolyse gewährleistet (1, 24, 26, 31, 34). Die Reduktion erfolgt zu ca. 92% über die anaerobe Glykolyse und zu ca. 8% über den aeroben Hexosemonophosphat-Shunt (13). Im ersten Falle ist die Reduktion des Met Hb von DPNH abhängig, im zweiten von TPNH (Tab. II). Da die Reduktion mit DPNH durch die Diaphorase vermittelt wird, führt eine Insuffizienz zu einem Anstieg an Met Hb. Damit wird auch die deutlich verminderte oder fehlende Rückreduktion von Met Hb mit Laktat oder Laktat + Methylenblau erklärt, bei welcher DPNH

und Diaphorase beteiligt sind (22) Die Rückreduktion mit Glukose verläuft hingegen normal, weil die TPNH abhängige Reaktion ohne Diaphorase erfolgt (11-12) Die beschleunigende Wirkung von Methylenblau auf die Reduktion mit Glukose führt sogar zu einer nahezu totalen Umwandlung von Met Hb zu Hb. Diese Beobachtung bildet die Grundlage der Behandlung des Leidens.

Der Fermentdefekt muß relativ schwer sein bis eine Störung eintritt ein mittlerer Abfall der Aktivität, wie dies bei den heterozygoten Merkmalsträgern vorliegt, führt nicht zur Methämoglobinämie. Deshalb ist es auch nicht möglich, Heterozygote durch die Bestimmung des Met Hb zu erfassen. Erst die Einführung ferment spezifischer Methoden ermöglichte es 1960 Scott *et al.* (42) heterozygote Familienglieder zu ermitteln die Diaphoraseaktivität der Heterozygoten lag zwischen den bei Homozygoten und Normalen ermittelten Werten. Bei der oben beschriebenen Familie konnte in ähnlicher Weise eine partielle Verminderung der Diaphorase bei der noch lebenden Mutter den 5 direkten Nachkommen der beiden cyanotischen Probanden und zwei entfernteren Nachkommen der väterlichen Linie (Tab. I) festgestellt werden. Nur in einem Fall (IV/13) war die Diaphorase mit 5,3 Δ OD/Min/mg Met Hb im unteren Bereiche der Norm. Dieser 3jährige Knabe wurde während der Enzymuntersuchung für eine Eisenmangelanämie behandelt, so daß offenbar eine junge, regenerierende Erythrozytenpopulation vorlag, deren Gehalt an Diaphorase sowie anderer Enzyme etwas höher liegt als in normalen, mehr gealterten Zellen (3-4-30)

Eine weitere Möglichkeit, heterozygote Träger nachzuweisen wurde von BETKE *et al.* (6) im Methämoglobin-Reduktionstest mit Laktat geprüft. Die genannten Autoren fanden intermediäre Werte bei Heterozygoten. Die eigenen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse nur teilweise reproduzieren, obschon die Rückreduktion des Patientenblutes immer am Tage der Blutentnahme gleichzeitig mit einem Kontrollblut durchgeführt wurde. Wie aus Tab. I und den Abb. 1 und 2 hervorgeht, konnte eine verminderte Rückreduktion mit Laktat und auch mit Laktat + Methylenblau nur bei der Mutter (II/3) erhalten werden, bei den untersuchten direkten Nachkommen war sie hingegen im Grenzbereich oder normal.

Die symptomatische Behandlung der Methämoglobinämie besteht in der Verabreichung von reduzierenden Substanzen. Methylenblau wirkt rasch und eindeutig, Vitamin C per os

langsam und nicht so intensiv. Die perorale Behandlung genügt jedoch, um die ästhetischen Aspekte des Leidens zu korrigieren. Trotz der oft beobachteten kompensatorischen Polyglobulie sind von dieser Seite keine Komplikationen bekannt, und die Prognose des Leidens ist gut.

Zusammenfassung

Diese Untersuchung betrifft 27 Mitglieder einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie. Dabei wurden zwei cyanotische Brüder mit sehr tiefer Erythrozyten-*Diaphorase* als homozygote und 7 direkte Vorfahren oder Nachkommen und 2 entferntere Verwandte der väterlichen Linie mit einer Verminderung der *Diaphorase* — of etwa mittleren Bereich bei normalem Methämoglobin-Gehalt als heterozygote Träger des Leidens erfaßt.

Summary

This study concerns 27 members of a family with congenital methemoglobinemia. Two cyanotic brothers with low red cell *diaphorase* were found to be homozygous carriers of the genetic defect. In 7 direct descendants and in 2 remote paternal relatives without cyanosis, heterozygous inheritance was ascertained by reduction of red cell *diaphorase* to an intermediate level.

Résumé

27 membres d'une famille atteinte de méthémoglobinémie congénitale font l'objet de cette étude. Chez 2 frères cyanotiques ayant un taux de *diaphorase* érythrocytaire très bas se trouva la forme homozygote de cette maladie et chez 7 de leurs descendants directs, ainsi que chez deux parents éloignés du côté paternel, la forme hétérozygote, se manifestant par une réduction moyenne de la *diaphorase*, le taux de méthémoglobine restait normal.

Literatur

1. ANDERSON, E. Studies on the presence of non-carbon monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood. *Chem. 130*: 563 (1941)
2. BARONOFF H.; GEMON, Q.-H.; HARRISON, D. C. AND MCILURAY J. Familial idiopathic methemoglobinemia and its treatment with ascorbic acid. *Clin. Sci. 5*: 145 (1945)
3. BERKOWITZ, R. Z. Alterations in metabolic energy and cation transport during aging of the red-cells. *J. clin. Invest. 32*: 1572 (1959).
4. BETKE, K.; BALZ, A.; KLEINMAYER, E. UND SCHOLZ, P. Methämoglobingehalt, Methämoglobireduktion und Sauerstoffverbrauch in jungen und alten Erythrozyten. *Blut 6*: 203 (1960).
5. BETKE, K.; GRÖSCHNER, E. UND BOCK, K. Properties of a further variant of Hæmoglobin M. *Nature (London) 188*: 864 (1960)
6. BETKE, K.; STROH, H. UND TIBBE, O. Untersuchungen einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie durch Reduktasenmangel. *Dtsch. med. Wochr. 87*: 63 (1962)
7. BRUTLER, E. The glutathione instability of drug sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. *J. Lab. clin. Med. 49*: 84 (1957)

8. BOON, L.: Fälle von familiärer Methämoglobinämie aus zwei Sippen. *Intern. Den. Ann. paediat.* 207: 435 (1963).
9. BOLT W.; ZERLETT G. UND RITZEL, F. Die kongenitale Methämoglobinämie und ihre Bedeutung bei der Differentialdiagnose der Zyanose. *Dtsch. med. Wochr.* 82: 2247 (1963).
10. BRAKAY V. K., GIBSON Q. H. AND HARRISON, D. C. Familial idiopathic methemoglobinemia. *Lancet* 207: 935 (1951).
11. BREWER, G. J. TARLOW A. R. AND ALVINO, A. S. The methemoglobin reduction test for primaquine type sensitivity of erythrocytes. *J. Amer. med. Ass.* 180: 386 (1962).
12. BREWER, G. J. TARLOW A. R. AND ALVINO, A. S. Methemoglobin reduction test. *Bull. Org. mond. Santé* 22: 633 (1960).
13. CARTIER, P. ET BOCCARD, M. Le métabolisme phosphoré des érythrocytes. III. La glycolyse des globules rouges humains. *Revue franç. et clin. biol.* 8: 393 (1963).
14. GAWDEY, M., BERTLER, C. H. AND LAPPAT E. J. A study of methemoglobinemia due to congenital diaphorase deficiency. *J. Lab. clin. Med.* 60: 866 (1963).
15. COOCHEN, A. A genetic study of the hereditary methemoglobinemic cyanoses. *Acta genet. stat. med.* 7: 131 (1957).
16. EDER, H. A., FISCH, C. AND MCKEE, R. W. Congenital methemoglobinemia. A clinical and biochemical study of case. *J. clin. Invest.* 38: 263 (1949).
17. EVELYN, K. A. AND MALLOW H. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin in a single sample of blood. *J. biol. Chem.* 125: 635 (1938).
18. FISCH, C. A. Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. *New Engl. J. Med.* 239: 470 (1948).
19. GERALD, P. S. The electrophoretic and spectroscopic characterization of haemoglobin M. *Blood* 13: 936 (1958).
20. GERALD, P. S., COOK, C. D. AND DRABFORD, L. K. Hemoglobin M. *Science* 125: 300 (1957).
21. GERALD, P. S. AND GEORGE, P. Second spectroscopically abnormal methemoglobin associated with hereditary cyanosis. *Science* 129: 393 (1959).
22. GIBSON, Q. H. The reduction of methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia. *Biochem. J.* 42: 13 (1948).
23. GIBSON, Q. H. AND HARRISON, D. C. Familial idiopathic methemoglobinemia. Five cases in one family. *Lancet* 6: 941 (1947).
24. GROSCHANS, F. UND LÖWER, G. W. Über die Hemokinasen im menschlichen Erythrocyten. *Klin. Wochr.* 38: 796 (1960).
25. HANSEN, H. A., JACENTJERG, O. R. AND JOHANSSON, B. G. Studies on an abnormal hemoglobin causing hereditary congenital cyanosis. *Acta paediat.* 49: 503 (1960).
26. HILL, A. S., HAUT A., CARTWRIGHT, G. E. AND WINTROBY, M. M. The role of nonhemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation *in vitro*. *J. clin. Invest.* 43: 17 (1964).
27. HÖLLERER, H. UND WERNER, G. Über chronische, familiäre Methämoglobinämie und eine neue Modifikation des Methämoglobins. *Dtsch. med. Wochr.* 73: 476 (1948).
28. JOSEPHSON, A. M., WEINSTEIN, H. G., YARLES, V. J., SIMON, L. AND HELLER, P. A new variant of hemoglobin M disease. *Hemoglobin M Chicago. J. Lab. clin. Med.* 39: 918 (1962).
29. KORNBERG, A. AND HORECKER, B. L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In COLOWICK' and KAPLAN' *Methods in Enzymology* vol. 1 323-327 (Academic Press, New York 1955).
30. LÖWER, G. W., WALLER, H. D., KAMMER, O. UND SCHNEIDEL, R.: Beziehungen zwischen Zellstoffwechsel und Zelltod von *de-adre-* und *de-adre-aktiven* Erythrocyten. *Proc. 7th Int. Congr. Rome 1958* (Karger, Basel / New York 1959).
31. MALIK, A. AND DEBOSTEDT O. F. The metabolism of the erythrocyte. X. The inorganic pyrophosphatase of the erythrocyte. *Canad. J. Biochem.* 34: 121 (1956).

32. MARTI, H. R.: Hereditäre Enzymdefekte der Erythrocyten. Schweiz. med. Wochr. 87: 1430 (1962)
33. MARTI, H. R.: Normale und anomale menschliche Hämoglobine, p. 197 (Springer Berlin/Göttingen/Heidelberg 1963)
34. MILLER, G. C. AND RANDALL, H. P. Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. J. biol. Chem. 237: 569 (1958).
35. NEWCOMB, C. P. AND DAWSON, J. Two cases of congenital methaemoglobinemia. Brit. med. J. i. 1396 (1958)
36. PROUTY, A. V. EASE, B. N. AND HIDE, J. E. Clinical and laboratory features of two variants of methemoglobin M disease. J. Lab. clin. Med. 54: 73 (1959)
37. DE PRIZ, H. E. AND HICKMAN, M. J. Familial congenital methemoglobinemia. Report of case and family study. Ann. intern. Med. 51: 1078 (1959)
38. ROSS, J. D.: Deficient activity of DPVH-dependent methemoglobin diaphorase in sick blood erythrocytes. Blood 27: 51 (1963).
39. ROSS, J. D. AND DYERWOLD, J. F. Reduction of methemoglobin by erythrocytes from cord blood. Pediatrics 27: 718 (1959)
40. ROSS-FANELLI, A. ANTOSKI, E. AND MOSKOWI, B. Ferrithemoglobin reduction in normal and methemoglobinemic subjects. Clin. chim. Acta 2: 476 (1957).
41. SARAWI, E. HEDIGER, H. UND BETTEL, K. Sporadisches Auftreten von Hb M (Boston Typ?) in einer mitteleuropäischen Familie. Schweiz. med. Wochr. 82: 1090 (1962).
42. SCOTT, E. M. The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. J. clin. Invest. 39: 1176 (1960)
43. SCOTT, E. M. AND GRIFFITH, L. V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia diaphorase. Biochem. biophys. Acta 34: 584 (1959)
44. SUGIYATA, F. TAMURA, A. ITOH, I. AND TAKASHI, H. Hemoglobin M. Demonstration of new abnormal hemoglobin and hereditary spheremia. Acta haemat. jap. 23: 86 (1960).
45. TOWNES, P. L. AND LOVELL, G. R. Hereditary methemoglobinemia. A new variant exhibiting dominant inheritance of methemoglobin A. Blood 18: 18 (1961).
46. TOWNES, P. L. AND LOVELL, G. R. Investigations of the defect in a variant of hereditary methemoglobinemia. Blood 18: 60 (1961)
47. WALLER, H. D. UND LÖWEN, G. W. Enzymdefekt bei angeborener Methämoglobinämie. Folia haemat. N. F. 6: 73 (1961)

The T ylor Research Laboratories, Children's Hospital, Sheffield; and University
Maternity Hospital, Alexandra Athens

Human Bone Marrow During the Last Three Months of Intrauterine Life

A Histological Study

By PITSIA K. KALPAKTZOULO AND J. L. EMERY

The bone marrow of the human foetus has been studied in many ways (1 2 3 4). These studies have either involved bone marrow aspirations (5 6, 7) or gross manipulation of bones of the dead foetus or infant (8). We have found no attempt to study this subject using quantitative estimates of the cells of the marrow tissue done on sections of identical marrow samples from foetuses. The only approach possible is to examine children born at different ages of gestation and in whom the premature birth has been due to accident and not disease.

Ribs have been used by several workers for the study of bone structure and development (9 10 11 12) one of the chief advantages of the rib being its relative uniformity of structure. The rib also appears to be the best bone for histological study of the marrow as the wall of the rib in the foetus is so thin that adequate fixation of the marrow takes place rapidly through it.

This paper records an attempt by use of the rib, to estimate the type and number of cells in the marrow of the rib during the latter half of pregnancy.

Material and Methods

The bones used came from a file of ribs from over 2,500 foetuses and infants that have been collected over a period of 10 years as part of the routine necropsy procedure of the Children's Hospital, Sheffield. The method of collection and processing has been as follows:

The cartilage of the 4th rib of the right chest is cut at approximately one-fourth from the costochondral junction and the shaft of the rib at about the mid point between the sternum and spine. After trimming excess muscle, the rib is fixed in 10% formal saline

for a few days. Then the edges of the rib are trimmed back, cutting with an extremely sharp knife, from the cartilage to the shaft. This produces a block of about 5 mm thickness, exposing marrow on both sides and occupying the centre of the rib and at right angles to the costochondral junction. After fixation for a few more days, the rib is decalcified in 5% nitric acid after which the shaft of the bone is trimmed to about 5 cm from the cartilage.

After routine processing, 5 μ sections are cut across the marrow face and stained by a variety of methods, including Mason's trichrome and Giemsa. Neutral formal saline was used as a fixative rather than Zenker or Bouin as, in our hands, the latter fixatives produced no better results than formal saline.

An earlier study had been done on a series of selected normal ribs. Transverse strips of rib at intervals of 2 mm from the costochondral junction were drawn and the tissues and cells counted. This showed that at a distance of 5 mm from the cartilage, the bone marrow had reached full cellularity and showed least variation in cell content (15).

For the present study a very careful selection of ribs from the total series available was made, the ribs being selected in the following way: a) Only ribs from children still-born or dying within 5 hours of birth were used. b) Any rib showing any abnormality of the costochondral junction was excluded. c) If there was any history of toxemia of pregnancy, diabetes, or any other disease in the mother the rib was also excluded.

This selection meant that exclusion of a very large number of children including the majority of children that normally come under the heading of 'prematures' and thus, the ribs used came from children who had apparently died due to virtual accidental causes or illness of such short duration as to produce no recognizable pathological lesions. From well over a thousand postmortem ribs and tissues studied, only 56 apparently completely normal ribs were found. This selection was made before any of the quantitative studies were carried out.

The sections were studied in the following way. A thin line was drawn across the top-surf of the section parallel to the costochondral junction and exactly 5 mm from it. The rib was projected on to Bristol board, through a standardized projection microscope. On the board, a pair of parallel lines at 2 cm distance had been drawn in Indian ink. A complete tracing across the whole width of the rib was made, mapping out all the rib structures including the capillary walls surrounding the cellular marrow spaces, the cartilage, bone and periosteum. The distinction between the vessel walls and the marrow space was very rarely in doubt, being much more obvious than in the case with normal adult marrow.

When the strip had been mapped out, nuclear counts were done of the marrow cells in the spaces mapped within the parallel lines, the number of nuclei being written into the areas. The pieces of paper were then cut out and the marrow areas weighed, from which, using the weight of cut-outs done from micrometer scales, the areas of the different pieces were calculated.

The rib section was then transferred to the ordinary microscope and under the oil immersion, using a high-line eyepiece, differential count was carried out across the identical area to that drawn and cut out. Counts were only carried out on sections that were stained satisfactorily and in which the cell differentiation could be made with confidence. This necessitated the exclusion of one case.

The erythroid cells were divided into two groups, depending upon the size of the cells, normoblasts and macro-normoblasts. Further differentiation was not possible.

Differential counts were done by several observers and showed no greater lack of consistency than counts done on routine fresh marrow smears.

The cases were grouped for purposes of analysis in two ways. The still-borns, together with the babies dying within 5 hours of birth, were grouped into 5 categories based on crown rump length; group I being 14 to 22.5 cm, group II 22.6 to 27.5 cm, group III 27.6 to 31.5 cm, group IV 31.6 to 35.5 cm, and group V 35.6 to 39 cm.

Table I

The amount of tissue measured (sq mm) in rib sections from stillborns of different gestations.

No. of cases	C.R. length in cm range and mean.		Total	Marrow	Vessels	Cartil.	Perimeter	
							mm	mm
10	14-22.5 (19.4)	Mean	0.103	0.032	0.021	0.026	0.818	1.71
		S.D.	0.020	0.010	0.008	0.007	0.007	0.13
		S.E.	0.006	0.003	0.003	0.002	0.001	0.03
10	22.6-27.5 (25.5)	Mean	0.157	0.050	0.023	0.035	0.809	1.75
		S.D.	0.034	0.013	0.008	0.014	0.009	0.18
		S.E.	0.008	0.004	0.003	0.004	0.001	0.04
11	27.6-31.5 (29.6)	Mean	0.153	0.032	0.024	0.033	0.811	1.75
		S.D.	0.016	0.013	0.012	0.006	0.002	0.03
		S.E.	0.005	0.004	0.004	0.002	0.001	0.02
12	31.6-33.5 (33.5)	Mean	0.193	0.080	0.016	0.055	0.812	1.75
		S.D.	0.020	0.018	0.007	0.010	0.002	0.03
		S.E.	0.006	0.005	0.002	0.003	0.001	0.02
13	33.6-39. (36.9)	Mean	0.215	0.102	0.024	0.055	0.813	1.75
		S.D.	0.032	0.020	0.013	0.013	0.009	0.15
		S.E.	0.009	0.006	0.004	0.004	0.001	0.03

The same babies were also grouped on gestation age as follows: group I 15 to 27.5 weeks, group II 27.6 to 31.5 weeks, group III 31.6 to 33.5 weeks, group IV 33.6 to 39.5 weeks, group V 39.6 to 43 weeks. While these groups are roughly comparable, the actual cases comprising the groups based upon the different criteria are not the same. The children fall into different groups under different criteria, hence the need for the double grouping.

The weighed portions of the tracings having been converted into areas could then be, based upon the 3/8 section thickness, converted to volumes of tissue. As the number of nuclei counted in this area was available, the number of cells counted per cm² area could be roughly estimated. It was appreciated that inaccuracies, due to the varying size of the cells counted, of necessity occur (14) and that, the estimate of megakaryocytes must be greatly in excess of reality. In view of the use of an identical method throughout the bone survey and the apparent consistent relative size of the cells, it did not appear to be justified to do differential cell size measurements and make the required corrections.

When the absolute cell counts had been estimated, the standard deviation of the estimates in each group was made and the standard error of the mean worked out, using the formula $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$. Statistical analysis between groups was worked out using probability tests (15).

Results

The total amount of tissue measured in the complete cross-section of ribs from 56 infants, together with the amounts of different types of tissue in the stillborn series, are shown related to crown rump length in table I.

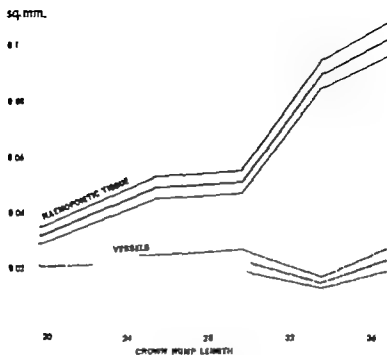


Fig. 1 The amount of space occupied by the haemopoietic tissue and by the blood vessels in comparable cross section of ribs from children dying during the last three months of intrauterine life.

The total amount of tissue surveyed increased progressively with the gestation age of the children and the crown rump length and, when the groups, both gestational and crown rump are analysed, there is a statistically significant increase ($P > 0.001$) between each successive alternate group with the single exception of the last group immediately prior to full term. The period of greatest increase is between groups 3 and 4 (33 to 37 weeks gestation, 30 to 33.5 cm crown rump length) where there is a significant increase ($P = 0.001$) between successive groups.

The different tissues do not all increase in amount equally. The «periosteum» remains constant and so does the size of the blood vessels. The latter can best be seen in figure 1. While there is a steady increase in the volume of the haemopoietic tissue, there is a great relative diminution in the vascular space.

The total number of cells and counts in the children stillborn and living less than 5 hours is given in table II and the means of

Table II

Total cells and different cell types of marrow haemopoietic tissue (in thousands per cu mm)

No. of cases	C.R. length in cm		Total	Mono- cytes	Lympho- cytes	Myeloid*			Mega- cytes	n
	range and mean.					Myelo- cytes	Metaro- phils.	Eosio- phils		
10	14-22.5 (19.4)	Mean	1044	177	21	368	99	13	14	11
		S.D.	239	133	48	170	78	17	15	14
		S.E.	82	48	15	54	25	5	5	5
10	22.6-27.5 (25.5)	Mean	1935	267	127	745	96	34	23	34
		S.D.	484	229	87	362	77	27	36	11
		S.E.	153	72	28	114	24	9	11	11
10	27.6-31.5 (29.6)	Mean	1735	190	110	529	132	62	28	41
		S.D.	304	117	124	175	85	54	57	11
		S.E.	96	37	39	55	27	17	13	11
12	31.6-35.5 (33.5)	Mean	1960	87	136	686	126	110	11	41
		S.D.	508	50	132	248	57	61	31	31
		S.E.	147	14	38	72	16	18	10	11
13	35.6-39 (36.9)	Mean	1683	80	112	631	129	83	35	31
		S.D.	411	28	92	283	60	38	29	11
		S.E.	114	8	26	78	17	11	8	11

Table III

Differential cell counts in the haemopoietic marrow tissue grouped on crown rump length

No.	C. R. length in cm		Meno- cytes	Lympho- cytes	Myelo- cytes	Myeloid*			Mega- thrombo- cytes	Ery- thro- cytes
	range and mean.	Neu- trophils				Eosino- phils	Baso- phils			
14	22.5	Mean	18.8	1.9	34.6	9.0	1.4	1.1	20.8	
	(19.4)	Range	0-50	0-3.8	20.8-52.6	2.9-17.6	0-3.5	0-3.1	4.3-41	
22.6-27.5		Mean	13.3	3.6	38.4	4.7	1.9	1.0	19.3	
	(25.5)	Range	0-31	3.3-44	11-42.1	0-26.8	0-5.8	0-4	3.8-37	
27.6-31.5		Mean	11.5	6.1	29.5	8.1	4.1	1.4	22.4	
	(29.6)	Range	1.1-21.9	0-20.2	15.6-50	2.2-15.9	0-12.5	0-5.1	10.6-38.9	
31.6-35.5		Mean	4.4	6.6	36.0	7.5	6.0	2.2	29.6	
	(33.5)	Range	0-8.2	0-15.3	22.2-50.5	1.2-35	2.2-11.8	0-3.3	7.3-41.5	
35.6-39		Mean	4.9	6.2	37.3	7.6	3.4	2.0	20.3	
	(36.9)	Range	1-9.2	0-18.4	26.4-50.5	1.1-11.1	1.1-10.6	0-5	8-51	

these groups are presented in figure II and related to gestation age in figure III

There is a statistical significant increase ($P = 0.001$) in the total cellularity of the marrow between foetuses of crown rump length of 20 cm and those of 26 cm, corresponding to between 25 and 30 weeks gestation. While during this period, there appeared to be an increase in all of the cell types, the only groups showing a statistically significant increase (of over 0.001) were the lymphocytes. The

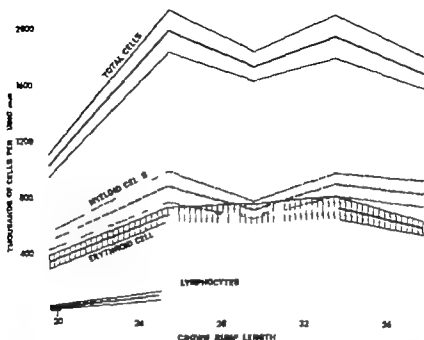


Fig. 2. The concentration of cells found in the haemopoietic tissue of the rib marrow in stillborns dying during the last three months of intrauterine life.

increase in granulocytes was only significant at $P = 0.01$ and the combined normoblasts and macronormoblasts at the same level.

From this period onwards i. e. after 26 cm crown rump length and 30 weeks gestation, there was no significant change in the total number of cells or in the number of granulocytes or red cell precursors. The only individual cells otherwise showing a progressive increase throughout this period were the eosinophils, which showed a significant rise ($P = 0.001$) between 20 cm and 33.5 cm (25 weeks and 37 weeks gestation).

When the figures are looked at from a proportional viewpoint, there is little change throughout the whole of this period in the differential cell counts (table III). The granulocytes in the period of approximately 26 weeks maturity were 45% and rose to 50% at term. The nucleated red cell series commenced at approximately 33% and at term were less than 40% (fig. 3).

The lymphocytes were approximately 2% at 20 cm crown rump length (26 weeks gestational age) but at 26 cm crown rump

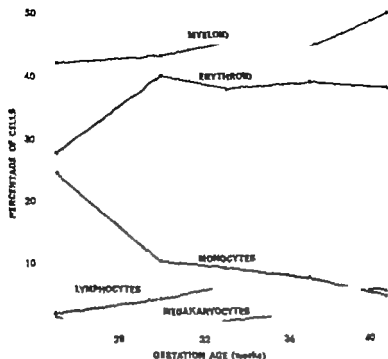


Fig. 3. The proportion of the different types of cells found in the haemopoietic tissues of marrow sections from children dying during the last three months of intrauterine life.

length (30 weeks gestational age) they were approximately 8 / and remained at this level throughout the rest of the period studied. In the youngest age group we estimated monocytes at 18 / but these cells were at that time, indistinguishable from connective tissue cells and the apparent progressive fall in the proportion of these cells is probably artifactual.

Discussion

The study of human tissues from the age groups that we have attempted here is almost overwhelmed by possible errors. Until relatively recently cerebral birth trauma, antepartum haemorrhage and neonatal inhalation were accepted as accidental deaths and the chemist and the anatomist were content to accept the tissue from the majority of stillborn and neonate deaths as being essentially normal. The new change in approach can be seen in the amount of

selection that we had to make to obtain normal tissue in this age group.

From over 1000 necropsies on stillborns, we were able to select only 56 in which there was no obvious possibility of the child having been in a state of nutritional insufficiency prior to birth or death. The majority of so-called 'prems' had to be eliminated, most of these infants being small and wasted due to prolonged intrauterine undernutrition. The second error is that of maturity based on the mother's menstrual history and obstetric findings. The errors here are as great as that of the weight of the child which can be raised or lowered by retention of water or the elimination of meconium. Thus, we have largely used the crown rump length as the most reproducible and reliable measurement of a newborn child and, in particular one that we are able to make ourselves.

Our findings suggest that the growth of the different elements of the rib continues in a uniform pattern during the last three months of intrauterine life. The actual rate of growth may not be uniform and our figures suggest that there is a period of accelerated growth during the time when the child is between 30 and 34 cm crown rump length, which corresponds approximately to the 33rd and 37th gestational week. This corresponds to the time when the placenta is believed to be at the height of its efficiency (16).

One feature that was a little surprising in our results was the lack of increase in the marrow blood vessels when compared to the increase in the actual haemopoietic tissue. A comparable change has been noted by many to occur in the earlier months of gestation (13 17 18 19) and what we have seen is a continuation of this change into the later part of pregnancy.

The next point that arises from our results is the inconsistency between the number of cells that we find in the bone marrow which is in the region of 2000000 cells/cu mm and the counts obtained by workers such as GAIRDNER *et al.* (20) who attempted to estimate the activity of the bone marrow of the newborn child by doing absolute cell counts on marrow aspirates. It would be remarkable if our figures were comparable, owing to the variable diluting effect of the circulating marrow blood on marrow aspirates. Our counts were done on the haemopoietic tissue in the bone, with the complete exclusion of the circulating blood.

The method that we have used does not directly give an absolutely correct differential estimate of the number of cells

present, for the reasons of cell size mentioned previously and in any case, it would probably be impossible to make a correct assessment of the degree of shrinkage that occurred in individual sections as a consequence upon fixation and processing. A further factor is that noted by CALLEN AND LIMARZI (21) who, working on the blood and bone marrow in renal disease, found a higher concentration of cells in the post mortem marrow than was suggested by their studies of aspiration marrow. They explained an increased post mortem cellularity on a terminal diminution in the rate of discharge of cells while in the agonal state.

Direct observation of the cells in the marrow sections suggests that the concentration of nuclei in the tissues surrounding blood vessels is more than a quarter that of the concentration of red cell seen in the local blood vessels. If the concentration of the latter is in the region of 5 000 000/cu mm, this would suggest a marrow cell cellularity of well over 1 000 000 cells. Thus, we feel that the counts we have obtained are probably much more realistic than those obtained by workers using marrow aspiration.

Our findings suggest that until the 30th gestational week, the marrow tissue is not fully haemopoietic but that from this point onwards, the marrow is at full foetal cellularity which remains roughly constant throughout the last ten weeks of intrauterine life.

We have found no great change in the proportion of cells during this later third of intrauterine growth. The period that we have studied is a little later than that which interested YOFFEY AND THOMAS (18). They found that during the 10th to 14th week of gestation foci of lymphocytes were scattered in the marrow tissue and they suggest that the lymph cells are the primary haemopoietic cells. In our own material, there appears a progressive increase in the number of lymphocytes throughout the whole period studied. We did not find any lymph follicles and must assume with YOFFEY AND THOMAS (18) that the lymphocytes have infiltrated into the marrow from the circulating blood.

Summary

Quantitative histological studies were carried out on the marrow of the ribs from 56 stillborn and newborn children. There is a progressive increase in the quantity of marrow haemopoietic tissue throughout the last three months of intrauterine life, but no comparable increase in the marrow blood smears. Quantitative assessments of the cells in sections suggest that the marrow tissue reached full cellular activity by the 30th intra-

vious week and that no increased cellularity occurs or significant change in myelocytoid ratio occurs from this time until full term.

Zusammenfassung

Bei 56 Neugeborenen und Totgeburten wurde das Knochenmark der Rippen quantitativ histologisch untersucht. Es fand sich eine progressive Zunahme des hämopoetischen Gewebes während der letzten drei Monate des intrauterinen Lebens, jedoch zeigten die Blutkern des Markes keine entsprechende Vermehrung. Quantitative Schätzungen anhand der Schnitte ergaben, dass das Markgewebe seine volle Zellaktivität um die 30. intrauterine Woche erlangt und daß bis zum Termin keine weitere Zunahme des Zellgehaltes und keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von Granulo- und Erythropoese mehr erfolgen.

Résumé

Des études histologiques quantitatives de la moelle osseuse des côtes ont été faites chez 56 nouveau-nés et enfants mort-nés. Nous avons pu constater une augmentation progressive des tissus hématopoïétiques durant les 3 derniers mois de la vie intra-utérine. Les éléments de la moelle ne présentent cependant pas une augmentation analogue. Des estimations quantitatives des cellules faites sur des coupes suggèrent que le tissu de la moelle atteint sa pleine activité cellulaire qu'à la trentième semaine intra-utérine et qu'à partir de ce moment, il n'y a plus, jusqu'à la naissance à terme, d'augmentation du contenu en cellules, ni de changement du nombre relatif des cellules de la granulocytose et de l'érythropoïèse.

References

1. SARRIS, F. R. Bone Marrow - *Physiol. Rev.* 3, 191 (1923).
2. WESTROM, M. M. AND SETHMAGGER, H. B. Comparison of hematopoiesis in the fetus and during recovery from pernicious anemia, together with consideration of the relationship of fetal hematopoiesis to macrocytic anemia of pregnancy and anemia in infants. *J. clin. Invest.* 14, 837 (1935).
3. YORRY, J. H. THOMAS, D. B. AND RUSSELL, P. M. Studies in fetal blood-formation. II. Observations on the bone marrow. *J. Anat.* 94, 376 (1960).
4. KOURKOUNAKIS-KOORTONICHALOU, P. Further Considerations in the Study of Human Embryo Hematopoiesis. Thesis Univ. Athens (1959).
5. SHAPIRO, L. M. AND RAMEN, F. M. Sternal marrow changes during the first week of life. Correlation with peripheral blood findings. *Amer. J. med. Sci.* 202, 341 (1941).
6. TUCILANI, F. Ricerche ematologiche e sue sul midollo osseo nella prima infanzia. Il midollo osseo nel neonato terminale nel prematuro. *Pediatrics* 43, 636 (1953).
7. COOPER, R. P. Studies on the structure and function of bone marrow. I. Variability of the hematopoietic pattern and consideration of method for examination. *J. Lab. clin. Med.* 17, 831 (1932).
8. YORRY, J. M. The mobilization and turnover times of cell populations in blood and blood-forming tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 4, 516 (1956).
9. YOLLI, R. H. Studies on the chemical differentiation of developing cartilage and bone. I. General method alkaline phosphatase activity. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 85, 360 (1949).
10. YOLLI, R. H. AND BERTHIAUME, M. Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 81, 281 (1949).

11. Moss, M. L., Norack, C. R. and Robertson, G. G.: Critical developmental horizons in human foetal long bones. Correlated quantitative and histological criteria. *Amer J Anat.* 97: 155 (1933).
12. Winkert, H. W., Askeno, C. W., Dougherty, H. L., Nelson, M. M. and Evans, H. M.: Prenatal development of the skeleton in Long-Evans rats. *Anat. Rec.* 137: 659 (1959).
13. Kalpaktsoglou, E. K.: The Development of Haemopoiesis in Foetus, Newborn and Young Infants. Athens Graphic Art. J. Makris (1960).
14. Faarkø, O. and Kjaerskov, J.: Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry (Karger Basel/New York 1953).
15. Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers, 6th ed. (Oliver & Boyd, Edinburgh/London 1956).
16. Flaxman, L. B., Cowie, D. B., Hellman, L. M., Wilke, W. E. and Vongvorisut: The permeability of the human placenta to sodium in normal and abnormal pregnancies and the supply of sodium to the human fetus as determined with radioactive sodium. *Amer J Obstet. Gynec.* 53: 469 (1948).
17. Jönsson, E. M.: Changes in the morphology and function of the bone marrow after splenectomy. *Arch. Surg.* 5: 139 (1923).
18. Yoffey, J. M. and Thomas, D. B.: The development of bone marrow in the human foetus. *J. Anat.* 95: 613 (1961).
19. Hoopes, J. W., Ackerman, G. A. and Knott, R. A.: Vasculogenesis and erythropoiesis in the living yolk sac of the chick embryo. *Anat. Rec.* 147: 29 (1961).
20. Gardner, D., Mader, J. and Roscoe, J. D.: Blood formation in infancy. Part II. Normal erythropoiesis. *Arch. Dis. Child.* 27: 214 (1952).
21. Callen, J. R. and Lissauer, L. R.: Blood and bone marrow studies in renal disease. *Amer J clin. Path.* 32: 3 (1959).

Author's address: Dr J. L. Emery: Children's Hospital, Digfield 10 (England) and Dr Peter K. Kalpaktsoglou: University Laboratory Hospital, 'Alexandros' Athens (Greece).

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz (Direktor: Prof. Dr. R. Detschko)

Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten

VON H. E. MÜLLER UND F. GRÄMLICH

Der menschliche Erythrocyt ist wohl der am besten untersuchte Zelltyp bei dem unsere Kenntnisse vom molekularen Aufbau seines Stromas und Cytoplasmas, seiner Enzymausstattung, Energiebilanz und Lebensdauer seiner physiologischen und pathologischen Funktionen am weitesten fortgeschritten sind. Im Rahmen dieser vielfältigen Untersuchungen untersuchten wir die Adsorption von Plasmaproteinen an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten und konnten dabei zeigen, daß sich die quantitative Zusammensetzung dieses Plasmaproteinfilmes deutlich von der Zusammensetzung der Proteine im Plasma unterscheidet. Darüber hinaus konnten Aussagen über die Menge der an Erythrocyten adsorbierten Proteine gemacht werden.

Das Problem des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche von Erythrocyten wurde erneut 1940 von FURCHBOOTT (1 2) aufgegriffen. Er brachte damals die Formbeständigkeit der Erythrocyten mit einem Albuminfilmen in Zusammenhang. Später glaubte man diese Vorstellungen durch Kataphorese Versuche bestätigen zu können (3 4 5 6). Andere Autoren bezweifelten indes die Existenz eines speziellen, formgebenden Faktors (4 7 8).

Die vorliegende Publikation soll alle von uns bisher zu diesem Thema vorgelegten Arbeiten (9 10 11 12, 13 14 15) zusammen mit einem wesentlich erweiterten Versuchsmaterial kritisch sichten und neu auswerten. Dabei wird an Stelle der Größe P_0 in früheren Veröffentlichungen ein Extrapolationswert angegeben, dessen Deutung klarer und übersichtlicher erscheint. Er erlaubt zudem quantitative Aussagen über die Menge der an Erythrocyten adsor-

bierten Proteine unter den Verh \ddot{a} ltnissen des normalen Blutes im Gegensatz zum P_0 -Wert, der nur unter den speziellen experimentellen Bedingungen G \ddot{u} ltigkeit besa \ddot{z} .

Das Untersuchungsschema bestand, wie schon ausf \ddot{u} hrlich er \ddot{o} rtet wurde (10, 12, 14) in einer Isotopenverdünnungsanalyse. Die Auswertung geschah nunmehr durch Extrapolation der Verdünnungskurven auf Normalverh \ddot{a} ltnisse. Zum Vergleich sind neben den so erhaltenen Extrapolationswerten auch die alten P_0 -Werte angegeben (Tab. I).

Material

Human-Albumin wurde teils vom Radiochemical Centre, Amersham, als 125 I-Jod-markiertes Human-Albumin bezogen, teils wurde Human-Albumin erstens der Behring-Werke Marburg, mit 125 I-Jod markiert. Alle α_2 -Globuline (F \ddot{u} llungen, γ -Globulin, erstens Sedimentationskonstante 7 α_2 -saures Glykoprotein, α_1 -Makroglobulin, tryptophanreiches Pr \ddot{a} albumin und Transferrin) wurden ausschlie \ddot{s} lich von den Behring Werken, Marburg, bezogen und mit 125 I-Jod, bezogen vom Radiochemical Centre Amersham, markiert nach einer modifizierten Methode von FRIEDMAN und STRICKLAND (16) oder nach der Jet Methode von McFARLANE (17).

Die Entfernung des nicht an Protein gebundenen Jods erfolgte teils durch Dialyse, teils durch Perkolieren an Säulen von Sephadex G 25 bzw. Amberlite IR 45.

Der Gehalt an freiem Jod lag zwischen 0,2 und 8% (bei α_2 -saurem Glykoprotein). Der Nachweis erfolgte durch Trichloroessigsäure-Fällung des markierten Proteins und Bestimmung der Aktivität im Überstand. Bei dieser Methode wird ebenfalls protein-gebundenes Jod abgespalten, andererseits freies Jod adsorbiert an das denaturierte Protein gebunden. Die beiden Effekte besitzen gegenläufige Tendenzen und belegen die erhaltenen Werte mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor.

Wie eine Versuchsserie zeigte, lagen bei Mengen von <10% ungebundenem, freiem Jod die erhaltenen Werte (P_0 -Werte ebenso wie Extrapolationswerte) im statistischen Streubereich der Methode.

Die spezifische Aktivität der markierten Proteine lag bei allen Versuchen zwischen 2 und 10 μ Ci/mg.

Aussagen über die Aktivität des 125 I-Jod-markierten Proteins lassen sich nur mit Einschränkungen machen. Die elektrophoretische und immunoelektrophoretische Prüfung ergab keine Hinweise auf eine Denaturierung. Wie eigene Versuche zeigen, ist jedoch die Methode der Adsorption von Proteinen an Grenzflächen selbst ein guter Hinweis für die Nativität der Proteine. Dabei erhöht oder verringert sich bei st \ddot{u} rker Denaturierung die Adsorptionsfähigkeit der Proteine um den Faktor > 2 in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (18). In Zusammenhang damit stehen Untersuchungen von McFARLANE *et al.* (19) der bei seiner von uns übernommenen Jodierungsmethode (17) in ke keine Verringerung der Überlebenszeit von markierten Proteinen beobachtete, was für eine sehr weitgehende Nativität der Proteine sprechen dürfte. Auf Grund dieser Untersuchungen von McFARLANE, der engen Anlehnung an die von ihm beschriebene Jodierungsmethode und die indirekten Hinweise am dem Adsorptionsverhalten der Proteine selbst lä \ddot{s} t sich zumindest eine grobe, nachweisbare Denaturierung weitgehend ausschließen.

Methode

Das Blut gesunder Versuchspersonen wurde auf Oxalat abgenommen, je 3,2 mg Kaliumoxalat und 4,8 mg Ammoniumoxalat zu je 5 ml Blut. Die Proben wurden zentrifugiert und die cluffy-coats entfernt, um etwaige Effekte der Leukocyten und Lymphocyten möglichst zu verringern.

Zu je 5 ml so vorbehandeltes Blut wurden etwa 0,5–5 mg eines markierten Proteins zugesetzt, das Impulszahlen zwischen 3,5 und $20 \cdot 10^6$ Imp./min bei der gegebenen Versuchsanordnung aufwies. Bei Impulsangeboten unter $3 \cdot 10^6$ Imp./min blieben die erhaltenen Werte unabhängig von der zugesetzten Aktivität.

Das vorhandene Blut wurde 30–120 min zur Gleichgewichtseinstellung zwischen gelöst und adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Proteinmolekülen mit dem aktiven Protein inkubiert. Die Inkubationszeit von 30–120 min genügt dabei, wie eigene* und fremde Untersuchungen zeigten (20, 21) eine quantitativ vollständige Einstellung des Adsorptions-Desorptions-Gleichgewichtes. Danach wurde mit 5 ml Säure-Phosphatpufferlösung, pH 7,2 gut durchmischt, 5 min bei 1200 g zentrifugiert und vom Überstand jeweils wieder 5 ml abpipettiert. Nach Zugabe von wieder 5 ml Phosphatpufferlösung wurde die Erythrocytensuspension wieder gründlich durchmischt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde elfmal durchgeführt und in den so erhaltenen Waschüberständen die Aktivität des ^{125}I -Jod-Proteins mit einem Scintillationszähler mit Bohrlöchlristall der Firma Fricke & Höpfer Erlangen, gemessen. Die Kollidena wurde durch Verdünnung der Lösungen berücksichtigt. Nach beendeter elfter Washing wurde die Aktivität des Erythrocytensediments bestimmt. Aus den Aktivitätsmessungen der einzelnen Waschüberstände und der zuletzt an Erythrocytensediment gefundenen Aktivität läßt sich die Aktivität des Erythrocytensediments nach jeder einzelnen Washing berechnen.

Ergebnisse

Trägt man die Aktivität des Erythrocytensediments in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschvorgänge auf, dann erhält man die Kurven der Abb. 1 wobei die vorgegebene Gesamtaktivität zu 100 / angegeben ist. Die Aktivitäten fallen während der ersten Waschungen sehr rasch ab um dann für die einzelnen Proteine spezifische, etwa gleichbleibende Beladungswerte anzunehmen. Das Verhalten der Kurve läßt sich zwanglos mit der Annahme deuten, daß dem starken Abfall zu Anfang ein Verdünnungseffekt zu Grunde liegt, der so lange bestimmend ist, wie die Protein-Mengen im Überstand groß sind gegenüber den adsorptiv gebundenen Protein-Mengen. Bei den späteren Waschvorgängen dagegen ist dann das Milieu soweit an Protein verarmt, daß die adsorbierten Proteine stärker ins Gewicht fallen. Sie gehen entsprechend ihrem Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht zunehmend in Lösung in dem Maß wie das Außenmilieu an Protein verarmt und werden dann ausgewaschen. Damit erklärt sich der leicht abfallende Kurvenverlauf bei den letzten Waschvorgängen. Legt man diese

unverändert.

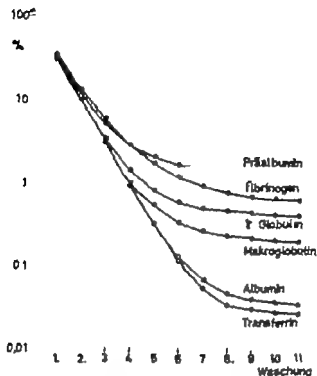


Abb. 1 Konzentrationsabnahme der Plasmaproteine an den Erythrocytenmembranen während 11 Waschungen (Nr 5).

Neigung und das bei den letzten Waschungen erreichte Niveau als Maßstab für die Desorption während der einzelnen Waschvorgänge als erste Näherung zu Grunde (tatsächlich handelt es sich auf Grund der FREUNDLICHschen Adsorptionsisothermen nicht um Gerade) und extrapoliert man damit auf die nullte Waschung, also auf das ungewaschene Blut, dann erhält man, wie Abb. 2 zeigt, die in Tab. I angegebenen Extrapolationswerte als ein Maß für die Menge der Proteine, die adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebunden sind. Weil aber in Wirklichkeit die Adsorption der Proteine an der Erythrocytenoberfläche keine lineare Funktion ihrer Konzentration darstellt, sondern FREUNDLICHschen Adsorptionsisothermen folgt, repräsentieren die erhaltenen Extrapolationswerte nur Minimalwerte des tatsächlich vorhandenen Filmes. Es ergaben sich prinzipiell die gleichen Werte, wie bei den PG-Werten vorhergehender Arbeiten, wenngleich die neue Auswertung die Differenzen bei der Adsorption verschiedener Proteine etwas mehr vergrößert. Aber auch bei dieser Auswertung gelangt man zu dem

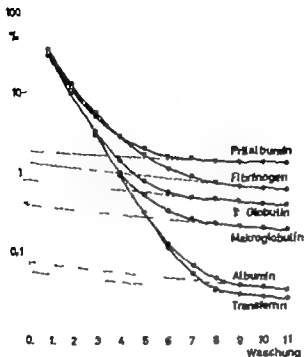


Abb. 2. Extrapolation der Kurven auf die Waschung 0 führt zu den Extrapolationswerten (EW) für Probe Nr. 3

Resultat, daß sich die einzelnen Proteine verschieden stark an die Zellmembran anlagern. In Tab. I sind alle Extrapolationswerte (EW) und auch die entsprechenden Pg-Werte zusammengefaßt, bei denen die oben diskutierten Voraussetzungen (geringer freier Jodgehalt, hinreichend hohes Impulsangebot, keine nachweisbare Denaturierung) erfüllt sind. Extrapolationswerte und Pg Werte stimmen bei Albumin, γ -Globulin und α_2 -Makroglobulin gut überein, bei Fibrinogen und Präalbumin sind die Extrapolationswerte kleiner und bei α_1 -saurem Glykoprotein und Transferrin sind die Extrapolationswerte größer als die entsprechenden Pg Werte. Es läßt sich also bei den Extrapolationswerten gegenüber den Pg Werten eine Nivellierung feststellen, bei der sich die Extremwerte (Präalbumin und Transferrin) näher kommen.

Die in Tab. II für die Extrapolationswerte aus Tab. I errechnete statistische Streubreite (quadr Mittel) ist beträchtlich, jedoch

Extrapolations- und P_0 -Werte zur Berechnung der Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten.

Nr	Albumin		Fibrinogen		Gamma-Globulin		Alpha ₂ -Glykoprotein		Alpha ₁ -Makroglobulin		Präalbumin		Transferrin	
	KW	P_0	KW	P_0	KW	P_0	KW	P_0	KW	P_0	KW	P_0	KW	P_0
1	0,13	0,038	0,80	1,46	0,82	1,33	—	—	0,28	0,39	1,10	2,36	0,103	0,053
2	0,138	0,062	0,89	2,02	0,73	1,45	—	—	0,36	0,60	1,42	3,55	0,074	0,043
3	0,076	0,077	1,10	2,73	0,77	0,97	—	—	0,38	0,49	1,75	3,76	0,054	0,047
4	0,138	0,033	0,71	1,24	1,07	2,12	—	—	0,97	1,73	4,17	10,16	0,194	0,180
5	0,049	0,036	0,18	0,22	0,36	0,43	—	—	0,28	0,46	1,23	1,63	0,10	0,122
6	0,243	0,103	0,68	0,66	0,38	0,39	—	—	0,25	0,23	—	—	0,41	0,600
7	0,32	0,130	0,37	0,43	1,41	1,99	—	—	0,21	0,26	—	—	0,076	0,089
8	0,043	0,044	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	0,040	0,032	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	0,277	0,403	0,43	0,180	0,081	0,089	—	—	0,15	0,164	0,35	0,83	0,059	0,058
11	0,214	0,30	0,086	0,172	0,11	0,115	—	—	0,08	0,088	0,53	0,73	0,068	0,070
12	0,35	0,277	0,17	0,191	0,17	0,060	—	—	0,20	0,229	0,43	0,74	0,30	0,037
13	0,26	0,34	0,13	0,151	0,11	0,147	—	—	0,21	0,18	0,43	0,48	0,078	0,082
14	0,281	0,308	0,16	0,160	0,095	0,038	—	—	0,12	0,086	0,52	0,97	0,021	0,023
15	0,34	0,578	0,22	0,210	0,23	0,083	—	—	0,19	0,072	0,63	1,51	0,100	0,073
16	0,35	0,396	0,19	0,208	0,57	0,214	—	—	0,12	0,082	1,59	2,37	0,096	0,098
17	0,31	0,369	0,19	0,295	0,15	0,164	—	—	0,24	0,230	0,81	1,45	0,193	0,151
18	—	—	—	—	0,046	0,041	—	—	0,21	0,187	0,28	0,20	0,11	0,043
19	—	—	—	—	0,29	0,034	—	—	0,27	0,133	0,23	0,297	0,20	0,036
20	—	—	—	—	0,06	0,043	—	—	0,20	0,136	0,26	0,170	0,078	0,044
21	—	—	—	—	0,003	0,032	—	—	0,23	0,216	0,23	0,21	0,12	0,037
22	—	—	—	—	—	—	—	—	0,83	0,708	0,37	0,432	0,34	0,045
23	0,15	0,034	—	—	0,30	0,137	—	—	—	—	2,6	0,039	0,17	0,012
24	—	—	—	—	0,14	0,067	0,56	0,100	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	0,17	0,064	0,27	0,030	—	—	1,38	0,028	0,08	0,020
26	0,28	0,019	—	—	0,30	0,279	0,12	0,015	—	—	1,15	0,080	0,43	0,015
27	0,30	0,009	—	—	0,4	0,061	0,24	0,019	—	—	0,82	0,060	0,36	0,019
28	—	—	—	—	0,30	0,20	0,79	0,178	—	—	—	—	—	—

Tabelle II

Zusammenfassendes Ergebnis der Untersuchungen und Berechnungen zur Zusammensetzung des Plasmaproteingehaltes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten.

Protein	pH	an Plasma (%)	an Erythr (%)	Adsorption am Erythr (ZVF in %)	Streuung	Zahl der Moleküle pro Erythrocyt	Anreicherungsfaktor
Albumin		57,5	48,9	0,219	$\pm 0,123$	110 000	0,85
Fibrinogen		3,1	5,1	0,42	$\pm 0,32$	2 800	1,65
γ -Globulin (78)		18,1	23,9	0,35	$\pm 0,34$	20 000	1,32
α_1 -Makro							
Glykoprotein		0,7	1,1	0,40	$\pm 0,28$	4 000	1,57
α_2 -Makroglobulin		2,8	3,2	0,29	$\pm 0,22$	800	1,14
Präalbumin		0,25	0,96	0,94	$\pm 0,66$	4 000	3,84
Transferrin		4,9	4,1	0,22	$\pm 0,23$	7 000	0,84

ergeben sich zumindest für die oben erwähnten Extremwerte deutlich unterscheidbare Adsorptionswerte.

Auf eine Einrechnung der individuellen Blutwerte (Hämatokrit, Erythrozytenzahl und Gesamtproteingehalt im Plasma) wurde aus dem gleichen Grund verzichtet. Es kamen generell Normalwerte (Hämatokrit 40 %, Erythrozytenzahl $4,5 \cdot 10^6 / 1 \text{ mm}^3$ Gesamtproteingehalt 7 g %) zur Berechnung weil die individuellen Streuwerte klein sind gegenüber den methodisch bedingten Fehlern. In die angegebenen \pm -Werte gehen dabei alle diese Faktoren gemeinsam ein. Den in Tab. II angegebenen Plasmaproteinwerten liegen

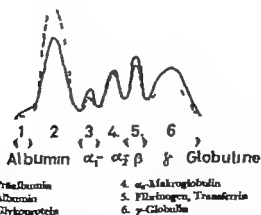


Abb. 3. Normales Elektrophoresediagramm von Plasma (gestrichelter Kurvenzug) und hypothetisches Elektrophoresediagramm der adsorptiv in anderer Verteilung an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Plasmaproteine (ausgezogene Kurve).

immunologische Bestimmungen zugrunde, wodurch sich die relativ hohen Werte erklären (22, 23)

Die Abb 3 soll die Werte der Tab. II graphisch darstellen, wobei der gestrichelte Kurvenzug dem normalen Elektrophorese-diagramm entspricht, während die ausgezogene Kurve das hypothetische Elektrophorese-diagramm der adsorptiv gebundenen Proteine darstellen soll.

Diskussion

Die Ergebnisse legen dar, daß der Erythrocytenoberfläche ein adsorptiv gebundener Plasmaproteinfilm anhaftet, dessen Zusammensetzung sich von der Zusammensetzung der im Plasma freigelösten Proteine deutlich unterscheidet. Die veränderte Zusammensetzung des Plasmaproteinspektrums an der Erythrocytenoberfläche gründet sich auf die unterschiedliche Bindungsneigung, das heißt die spezifische Adsorptionstärke der einzelnen Blut erweißkörper zur Oberfläche der roten Blutkörperchen. Hiermit übereinstimmende Teilbefunde wurden kürzlich auch von KLEVA (24) PIRORSKY *et al* (25) und HUGHES-JONES *et al* (26) mitgeteilt. Da das Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht der Proteine an der Erythrocytenoberfläche weitgehend auf Seiten der gelösten Anteile liegt, läßt sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur ein quantitativ kleiner Anteil des tatsächlichen unter Vollblutbedingungen vorhandenen Proteinfilms an der Erythrocytenoberfläche erfassen. Der Flächenbedarf dieser adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Moleküle ist selbst unter der Voraussetzung einer monomolekularen Schicht sehr gering. Mindestens 5-10 % der gesamten Oberfläche werden von dem beschriebenen Proteinfilm bedeckt.

Aussagen über die funktionelle Bedeutung dieses Proteinfilms an der Erythrocytenoberfläche sind spekulativer Art. Einmal läßt sich vermuten, daß der Zellstoffwechsel über die Adsorption spezifisch wirksamer Makromoleküle gesteuert werden kann, wie das bei der Pinocytose einzelner Zelltypen oder bei der Mitose von Leukocyten durch Phytagglutinen oder andere immunologisch wirksame Substanzen beobachtet wurde (26, 27). Zum andern läßt sich auch ein unspezifischer Effekt gleicher Art in Erwägung ziehen, wie er ebenfalls schon beschrieben wurde (28, 29).

Ob die an der Oberfläche besonders angereicherten γ -Globuline bezüglich immunologischer Reaktionen etwa als sessile Antikörper eine besondere Funktion zu erfüllen haben, muß offen bleiben.

Weiter wurde diskutiert, daß die Erythrocyten mit ihrer großen Gesamtoberfläche und ihrem Proteinfilm pathologische Plasmaproteine auf Grund ihrer Antigenität oder ihrer Denaturierung selektiv durch Adsorption binden und dann aus dem Organismus eliminieren (30-31). Zwar konnte unter pathologischen Bedingungen eine signifikant veränderte Adsorption verschiedener Proteine an die Erythrocytenoberfläche nachgewiesen werden (14), doch bleiben die Ursachen, die diesem Phänomen zugrunde liegen offen.

Zusammenfassung

Auf der Erythrocytenoberfläche befindet sich ein adsorptiv gebundener Plasma proteinfilm. Seine Zusammensetzung zeigt gegenüber der Zusammensetzung der im Plasma frei gelösten Proteine Verschiebungen.

Summary

A plasma protein film is adsorbed at the erythrocyte surface. The composition of this plasma protein film is different from that of the soluble plasma proteins.

Résumé

Un film de protéines plasmatiques est adsorbé à la surface des érythrocytes. Sa composition est différente de celle des protéines plasmatiques en solution.

Literatur

1. FURUKAWA, R. F. Disk-sphere transformation in mammalian red cells. *J. exp. Biol.* **17** 30 (1940).
2. FURUKAWA, R. F. AND FURUKAWA, E. Disk-sphere transformation in mammalian red cells. The nature of the antiphenic factor. *J. exp. Biol.* **17** 117 (1940).
3. HARRIS, E. J. Transport and accumulation in biological systems (Butterworth, London 1960).
4. FRANKLIN, T. A. J. The Red Cell (Blackwell, Oxford 1961).
5. FÖRER, W. UND RUMENSTROTH-BAUER, G. Untersuchungen über die Proteinadsorption an menschlichen Erythrocyten. *Klin. Wochs.* **34** 11 (1956).
6. RUMENSTROTH-BAUER, G. UND SACHSLEBER, F. In BAUERS Medizinischer Grundlagenforschung, Bd. II S. 637 (Thieme, Stuttgart 1959).
7. BROWN, E. A. The adsorption of serum-albumin by human erythrocytes. *J. cell. comp. Physiol.* **47** 167 (1956).

8. BANA, M. ET BACSA, M. Etudes au microscope Electronique sur l'adsorption, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Rev. Hmat.* 5: 396 (1950).
9. MLLER, H. E. UND GRAMLICH, F. Untersuchungen am natürlichen Serumproteinfilm der Erythrocytenoberfläche. *Acta haemat.* 29: 135 (1963).
10. MLLER, H. E. UND GRAMLICH, F. Die normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 334: 103 (1963).
11. MLLER, H. E. UND GRAMLICH, F. Ergänzende Untersuchungen zum Plasmaproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrocyten. *Naturwissenschaften* 50: 447 (1963).
12. GRAMLICH, F. UND MLLER, H. E.: Weitere Untersuchungen zum Serumproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrocyten. *Acta haemat.* 30: 236 (1963).
13. MLLER, H. E. UND GRAMLICH, F.: Die normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Oberfläche von Kaninchenerythrocysten. *Experientia (Basel)* 19: 571 (1963).
14. MLLER, H. E. UND GRAMLICH, F.: Die Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten bei verschiedenen Kristallbefllern. *Brit. J.* 10: 135 (1964).
15. MLLER, H. E. Die Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Oberfläche von Erythrocyten. 2nd Int. Congr. of Hemo- and Cytochemistry Frankfurt/Main, 1964 p. 154 (Springer Berlin / Göttingen / Heidelberg 1964).
16. FREEMAN, D. AND STERNBERG, L. A. The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity. *J. Amer. chem. Soc.* 72: 2226 (1950).
17. MCFARLANE, A. S. Labelling of plasma proteins with radioactive iodine. *Biochem. J.* 62: 135 (1956).
18. MLLER, H. E. Über die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung. *Imm.-Dis., Mainz* 1964.
19. COWEN, S., HOLLOWAY R. C., MASTRIVE, C. AND MCFARLANE, A. S. Distribution and elimination of 125 I- and 14 C-labelled plasma proteins in the rabbit. *Biochem. J.* 62: 143 (1956).
20. H. ORSH-JONES, V. C. AND GARDNER, B. The exchange of 125 I-labelled protein between red cells and serum. *Biochem. J.* 62: 404 (1962).
21. SCHUBOWITZ, H. Serologie und Klinik der autoimmunohmolytischen Erythrocyten-Erkrankungen der inneren Medizin und Kinderheilkunde (Springer Berlin / Göttingen / Heidelberg 1959).
22. SCHULTZ, H. E. UND SCHWICK, G. Quantitative immunologische Bestimmung der Plasmaproteine. *Behringwerk Mitteilungen* 31: 57 (1958).
23. WORMANN, F. UND MRK, H. H. Dysproteinhmies und Paraproteinhmies (Schwabe, Basel / Stuttgart 1963).
24. KLEIN, V. ber den Verlauf der Adsorptionsisotherme und der Desorption von Plasmaprotein bei gelagerten Erythrocyten. *Der 9. Tag. Dtsch. Ges. Hyg. u. Braunschweig* 1960. *Bbl. haemat.* 12: 105 (1961).
25. PIROVET, B., CORDOVA, M. AND IMU, T. Non-immunologic reaction of globulin molecules with the erythrocyte surface. *Von Sang.* 7: 334 (1962).
26. BARKMAN, P. AND BALLAN, A. Physicochemical separation of haemagglutinating and mitogenic principles. *Nature (London)* 200: 141 (1963).
27. AEPFORD, V. AND ROSSMAN, H. Mitotic stimulating effect of tuberculin on lymphocytes from peripheral blood. *J. Allergy* 31: 433 (1964).

28. KOLLET, H.; DIEBELMANN, H. UND JENNET F. Zur Frage der unspezifischen Wirkung von γ -Globulin. Hemmung metabolischer Funktionen der isolierten perfundierten Rattenleber durch humanes Standard- γ -Globulin. Helvet. med. Acta 3/ 169 (1964).
29. BRADSHILL, F. W. R., HENDERSON, W. A. AND MORRIS, I. G. A theoretical model of γ -globulin catabolism. Nature (London) 203. 1332 (1964).
30. DEGENHOF, R. Abwehrfunktion der Erythrocyten. Schweiz. med. Wochschr. 43. 1208 (1960).
31. GRAMMEL, F.: Die Bindungsfähigkeit roter Blutkörperchen. Ein Beitrag zur Pathogenese erworbener hämolytischer Zustände. Fol. haemat. 19 F 9-15 (1964).

Adresse der Autoren: Dr. Dr. H. K. Möller und PD Dr. F. Grammel, I. Med. Klinik und Poliklinik der Universität, Langenbeckstr. 1, 6300 Mainz (Deutschland)

gungen («eosinische Granulation»). Die Bezeichnung «eosinophil» für die Neutrophilen des Menschen wird nicht verwendet, da sie den Blutzellen mit auffallenden groben eosinophilen Granula, eben den «Eosinophilen» vergeben wurde.

Bei vielen Säugern (z. B. Hasenarten, Kaninchen, Meeresschweinen, Elefanten und Affenarten) ist die eosinophile Grundsubstanz der Neutrophilen deutlich eosinophil granuliert. Diese Neutrophilen werden oft als «Pseudoeosinophile» bezeichnet, um sie von den daneben vorhandenen «echten» Eosinophilen zu unterscheiden. Bei gewissen Nachtigallern können die Granula der «Pseudoeosinophilen» sehr grob und bedeutend größer als bei den Eosinophilen sein, z. B. beim Quastenfußler, dem *Cocleostich leucomeris chalumnae*. Oft ist die «pseudoeosinophile» Substanz der Neutrophilen, besonders bei primitiven Vertebraten auch kristallin spindel- nadelförmig und elliptisch geformt. In der Zoologie werden diese den Neutrophilen des Menschen entsprechenden homologen Blutzellen der Tiere oft als «Eosinophile Typ I» und die eigentlichen eosinophilen als «Eosinophile Typ II» bezeichnet. Die Situation wird noch verwirrt, da bei manchen Tierarten, z. B. den Schlangen, die Neutrophilen stark anurophil und nicht «pseudoeosinophil» granuliert sind. Diese werden dann in der Zoologie als «Anurophile» bezeichnet. Wer kann sich da auskennen, welche Zellart eigentlich gemeint ist, wenn er ohne eigene Erfahrung auf die Literatur allein angewiesen ist? Bei manchen Tierarten schließlich fällt das färbereiche und histochemische Verhalten gewisser Blutzellen vollständig aus dem Rahmen der sonst charakterisierenden Terminologie heraus. So sind beim Strandwolf (*Hyena brunnea*) und dem Königpapei (*Oryx capensis*) die Granula der Eosinophilen keineswegs eosinophil, sondern basophil («Pseudobasophile»), aber im Gegensatz zu denjenigen der echten Basophilen nicht metachromatisch, denn sie färben sich mit den üblichen blauen Farben ohne Farbumschlag rein blau. Ja, bei der Fleckenhyäne (*Hyena crocuta*) färben sich die Granula weder eosinophil noch basophil, sie sind farblos, chromophob. (Dasselbe ist nebenbei ein Beispiel, daß ausgesprochene Schmelzdrüsenunterschiede bis zu den Arten derselben Tiergattungen vorkommen können.) Auch histochemisch können tiefgreifende Unterschiede bei den Eosinophilen vorhanden sein: Beim Menschen, vielen Säugern und Nachtigallern sind es die Eosinophilen, welche die intensivste Peroxydaseraktion geben. Sie sind aber obligat peroxidasenaktiv bei vielen Nachtigallern, angefangen beim *Cocleostich*, bei den Caudaten, z. B. Salamandern, Tritonen und höher hinauf, unter den Säugern bei den Procarvia- Rhinoceros- Hyänen- und Katzenarten.

Die klassischen Bezeichnungen der drei segmentkernigen Leukozytenarten des Menschen, der Eosinophilen, Eosinophilen und Neutrophilen (auch «Granulozyten» genannt, doch ist diese Bezeichnung ungenau, da auch die Monozyten, Lymphozyten, Blutplättchen der Säuger Thrombozyten der Nachtigaller und die Gewebsbasophilen granuliert sind) sind nach ihrer Farbstoffaffinität geprägt worden. Wenn bei gewissen Tierarten die Farbstoffaffinität für dieselbe Zelle eine andere ist, soll man sie nach ihrer spezifischen Anfärbbarkeit anders als beim Menschen bezeichnen, wie es heute in verschiedenen Publikationen getan wird? Wir sind der Meinung, daß ein solches Vorgehen nur ein großes Durcheinander ergeben muß und daß jedenfalls vorderhand, bis sich irgendeine annehmbare allgemeine Lösung findet, die klassischen bestbekannten Bezeichnungen von der humanen Hämatologie benutzt werden sollten, auch wenn im speziellen Fall die Farbstoffaffinität nicht dieselbe ist. Jedermann weiß, was gemeint ist, und man kann daneben in Klammern die aufgetroffenen Synonyma setzen, z. B. Eosinophil und Gewebsbasophile (Mastzellen, Heparinozyten, Langerhans), Eosinophile (Auktophile, Eosinophile Typ II) Neutrophile (Heterophile, Pseudoeosinophile, Eosinophile Typ I Anurophile).

Die von JORDAN vorgeschlagene Bezeichnung «heterophile» für die den Neutrophilen des Menschen entsprechenden Leukozytenarten der Tiere ist an sich nicht schlecht, doch könnte diese Bezeichnung ebenso gut für die echten Eosinophilen ge-

braucht werden, die bei gewissen Tieren nicht eosinophil, sondern pseudoeosinophil resp. chromophob reagieren, also ebenfalls «heterophile» sind.

BARRETT befaßt sich in seiner Monographie mit den Granulocyten bei Mensch und Tier.

Im ersten Teil bespricht der Autor diese Leukocytenarten beim normalen Menschen und seinen erblich-konstitutionellen Anomalien. Von diesen kommen zur Sprache die Pelger Huët-Anomalie, die mittelstarke Segmentierung der Eosinophilenkerne, die Hochsegmentierung der Neutrophilenkerne, von welcher der Autor eine eigene Sippe beschreibt, die Anomalien von Alder, Chodak-Schubrick, May Higglin, Jordan's tetraphyle Vakuoisierung der Leukocyten bei der progressiven Muskeldystrophie Typ Erb und die monophyle Vakuoisierung der Lymphocyten bei der juvenilen asymmetrischen Idiote Try-Sachs. Bei einer eigenen Sippe des Autors, die er zur Alder-Anomalie stellen möchte, sind die Träger im Gegensatz zum echten Alder aber nicht homozygot, sondern heterozygot, der Erbgang ist daher nicht rezessiv sondern dominant und nur die Neutrophilen zeigen eine anormale Granulation, die allerdings beim Typ Hoettinger-Eichenberger der Alder-Anomalie auch vorkommt. Bei einem Individuum, dessen beide Eltern heterozygote Anomalieträger sind, ist das Merkmal mit einem rezessiven Erbleiden, der Atrophia gyrata Fuchs des Augenhintergrundes kombiniert, die übrigens beim Alder nie beobachtet wurde. Handelt es sich nicht um eine Anomalie sui generis, bei welcher wie bei der Lymphocytenvakuoisierung der juvenilen asymmetrischen Idiote das grob somatische, scheinbar rezessiv vererbte Zeichen homozygot, die nur im Mikroskop nachweisbaren kernlosen qualitativen Leukocytenveränderungen aber auch bei den Heterozygoten, dann als einziges Merkmalzeichen vorkommen? — Dieser Teil ist kurz und objektiv abgefaßt.

Der zweite, umfangreichere Teil befaßt sich mit den Granulocyten der Wirbeltiere. Es werden die Befunde wiedergegeben von 253 Blutuntersuchungen bei 164 Tierarten: 9 Fischen, 24 Amphibien, 41 Reptilien, 33 Vögeln und 55 Säugern. Die modernsten zoologischen Nomenklaturen werden benutzt. Die Blutausstriche wurden nach Pappenheim, mit der Perosynase nach Graham-Kouff und der Sedimentierungsmethode gefärbt und gezeichnet wurde das Phasenkontrastverfahren herangezogen. Auch dieser Teil ist sehr minutiös und fleißig verfaßt und ist eine Fundgrube für spätere Forscher auf diesem Gebiet. Auf eine Wiedergabe des ganzen Inhalts kann hier verzichtet werden. Es seien nur einige prinzipielle Objektionen gemacht, welche den Wert der Monographie nicht schmälern, Nachuntersucher aber behüten sollen, Fehldiagnosen zu übernehmen, die nur zu unrichtigen Diskussionsführungen und dem Fortschritt hemmen könnten.

BARRETT benutzt je nach dem färbereichen Verhalten für die Neutrophilen der verschiedenen Tierarten auch die Bezeichnung «Azurophile» oder «Eosinophile I» und diese sehr inhomogen. Er verwechselt bei den Crocodilia die Neutrophilen, die er «Eosinophile II» also echte Eosinophile bezeichnet, mit den letzteren, die er «Eosinophile I» also Neutrophile bezeichnet. Die entsprechenden Zellen der Maus und Ratte, die eindeutig neutrophil sind, werden als «Eosinophile I» bezeichnet, weil der Autor in ihnen glaubt pseudoeosinophile Granula zu finden. Umgekehrt bezeichnet er die Neutrophilen der Elefanten- und Affenarten, die sowohl vom Referenten untersucht, als pseudoeosinophile Granula enthalten, als «neutrophil» und nicht Eosinophile I, wie — nach der von ihm verwendeten Nomenklatur erwartet hätte. Daß es tatsächlich keine Maus hat, an der Vielfalt der Bezeichnungen für ein und dieselbe Zelle — den Neutrophilen — festzuhalten, wird durch die Hilflosigkeit von BARRETT noch unterstrichen.

In einem offensiblen Irrtum befindet sich der Autor wenn er die reifen runden Granulocytenkerne der Crocodilia, Testudines und Serpentes als segmentiert, sogar hochsegmentiert ansieht! Er schreibt wörtlich (S. 86) «Opinering de door verscheidene auteurs voorgedreefde mening als zou de kern van de granulocyten bij talrijke reptielen een reeds of ovale vorm hebben is zeker onjuist. Met behulp van dezelfde holopiketten die wij reeds bij het onderzoek der Amphibia vermeeld hebben (Auro-

kontrast en kleurfilters) is gemakkelijk aan te tonen dat de kern samengesteld is uit verschillende gesuperposeerde kernsegmenten.» Hier verwechselt BAARER offensichtlich die Segmentierung mit der Fragmentierung der Kerne. Bei allen Blutzörperchen verdichten sich mit zunehmender Reife die Kerne. Die Struktur des Basichromatins wird größer und es bilden sich in den rund bleibenden Kernen grobe Basichromatinschoffen. Besonders ausgesprochen und, wie bekannt, geradezu charakteristisch ist diese grobe Schoffenbildung der Kerne für die Pelger-Anomalie, die bei Mensch und Kaninchen vorkommt. Bei den reifen rundkernigen Granulokysten der Heterozygoten erfüllt das Basichromatin in 8 bis 12 grobe Schoffen, doch werden sie vom flüssigeren Oxychromatin kugelförmig, also rund, zusammengehalten. Mit dem Phasenkontrastverfahren hat STROME zeigen können, daß sie im Naturpräparat wohl noch die sog. «Kernbocher» erkennen lassen, daß sie aber mit Bestimmtheit nicht segmentiert sind. Diese intramitotischen Schoffen sind keine Segmente sondern Fragmente. Kerne sind erst dann segmentiert, wenn die Kugelform verloren geht und mit Fäden verbundene Teilstücke des Kernes sich im Protoplasma verteilen. Dessen Unterschied zwischen Fragmentierung und Segmentierung prüft man sich am einfachsten ein bei der Betrachtung der reifen bivacuolären Granulokystenkerne der Heterozygoten dieser Anomalie: diese Kerne sind segmentiert, das Basichromatin der Segmente ist zudem fragmentiert. Was für die reifen runden Pelgerkerne zutrifft, trifft auch für die reifen runden Granulokystenkerne der angeführten Tierverbindungen zu: diese Kerne sind rund und notwendig fragmentiert, aber nicht segmentiert. Es ist daraus auch verständlich, wenn der Autor die durch alle Fakten bisher unterstützte Ansicht des Referenten ablehnt, daß die phylogenetische Entwicklung der Kernformen von den reifen runden über die eingebuchteten zu den segmentierten und schließlich hochsegmentierten geht, denn für BAARER sind die runden Kerne segmentiert, teils sogar hochsegmentiert. Diese etwas auffällenden Schönheitsfehler wenn man sie erkennt, vermindern nicht den Wert der Monographie, denn sie bringt doch eine Fülle neuer Feststellungen auf dem Gebiete der vergleichenden Hämatologie.

UYS DE VRIJDE PIERAAR ist Chébotnik der Krügerischen Nationalparkes in Südafrika. Seine Monographie beschränkt sich auf die Beschreibung aller Blutzörperchenarten von 24 Reptilienarten (62 Blutzunahmen) seines Arbeitsgebietes. Wenn der Pappenbeinflug wurde eine Peroxydaseraktion und die Sodaschwärzmethode angewandt. Die neuere europäische Literatur über vergleichende Hämatologie ist dem Autor weitgehend unbekannt. Große Schwierigkeiten bereitet auch ihm die Terminologie, insbesondere weiß ihm als Zoologe die großen Erfahrungen der menschlichen Hämatologie kaum zur Verfügung stehen. Auf einer einzigen Tabelle führt er die von ihm benutzten Bezeichnungen und viele Synonyma an, illustriert sie aber glücklicherweise mit vielen guten Abbildungen auf 31 Tafeln und dazugehörigem Text. Wie sollte man sonst auch klar werden, was z. B. für Neutrophilie gemeint sind unter den Bezeichnungen «gran. vacuolated (senile) anurophil leucocytes», «plasmacytoid» «dysphocytes» und «histocytoid-anurophil» oder, bei den Roten, unter «dysphoid type erythroblast (lymphocyte-erythroblast transition)» «lymphoid type basophilic, polychromatophilic normoblasts» «lymphoid type pro-erythrocytes» usw.? Die Bezeichnung «eocrophil» verschwindet beinahe vollständig unter den Eosinophilen I und Anurophilen, wobei für den *Crocodilus niloticus* richtig die echten Eosinophilen als Eosinophile II, die Anurophilen als Eosinophile Typ I, entsprechend der vom Autor benutzten Terminologie bezeichnet werden. Mit der Auffassung des Autors, daß es im somatischen Leben der Tiere Übergangsformen der einen Blutzellart zur anderen geben würde, kann sich der Referent nicht befreunden. Insgesamt ist es eine sehr gute deskriptive Arbeit, deren Wert noch erhöht wird durch die Bemühungen des Autors, in die Systematik der verschiedensten Haemoprotozoen, die bei den wilden Tieren — selbst bei uns in der Schweiz — so häufig sind, Ordnung zu bringen. Auch diese Monographie ist für vergleichende Hämatologen oder solche, die es werden wollen, bestens zu empfehlen, wenn sie es an der nötigen Kritik, wie gegenüber allen Pionierarbeiten, nicht fehlen lassen.

E. UEBERTE, Basel

Alwall. *Therapeutic and Diagnostic Problems in Severe Renal Failure*. Verlag Munksgaard, Kopenhagen, 1963, 744 S., 279 Abb., Preis Dän. Kr. 402.-

Der Monographie von N. Alwall, Lund, Schweden, *Therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure* liegen Erfahrungen an 1057 Patienten zugrunde. Das 744 Seiten umfassende Werk läßt sich vor allem in drei große Abschnitte gliedern:

1) Technische Probleme betreffend apparativer Ausrüstung und räumlicher Organisation einer Nierenabteilung!

2) allgemeine diagnostische und therapeutische Probleme bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz und Anwendung der künstlichen Niere bei Intoxikationen und

3) spezielle Kasuistik der 1057 behandelten Fälle.

Besonders im letzten Abschnitt wird augenfällig, wie vielseitig die Anwendungsmöglichkeiten der künstlichen Niere sind. Akute Niereninsuffizienz erschwerter Ätiologie, akute Glomerulonephritis, chronische Glomerulonephritis, akute und chronische Pyelonephritis, Obstruktionen der ableitenden Harnwege, Nephrosklerose usw.

ALWALL widmet sich in seinem Buche nicht nur der Anwendung der künstlichen Niere, sondern er erwähnt in ausführlicher Weise die konservativen Behandlungsmethoden des Nierenversagens. Die Monographie kann aus diesem Grunde nicht nur dem Nephrologen, sondern auch den Allgemeininternisten und den Chirurgen zum Studium empfohlen werden.

Der allgemeine Eindruck, der durch ALWALLS Monographie vermittelt wird, liegt vor allem darin, daß sich seit 1945 eine medizinische Spezifität in nicht voranschreitendem Maße entwickelt hat, und daß durch neue Erkenntnisse und neue apparative Einrichtungen vielen medizinischen und chirurgischen Patienten das Leben erhalten werden kann.

Tabellen, Reproduktionen von Röntgenaufnahmen und eine ausführliche Bibliographie (1387 Zitate) ergänzen das Buch in vortrefflicher Weise. H. TADOKU, Basel

F. Hasegawa: Progress in Experimental Tumor Research, Vol. 5. S. Karger AG, Basel/New York 1964. 292 S., 76 Abb., 46 Tab., Preis sFr./DM 79.

F. Hasegawa: Progress in Experimental Tumor Research, Vol. 6. S. Karger AG, Basel/New York 1965, XII + 340 S., 43 Abb., 57 Tab., Preis sFr./DM 83.

Die von F. Hasegawa umsichtig redigierten «Progress in Experimental Tumor Research» haben in kurzer Zeit weite Verbreitung gefunden, so daß sich die Bände jetzt in kürzester Zeitabstände folgen. Gemäß der ursprünglichen Konzeption bringen auch die beiden neuesten Bände 5 und 6 aktuelle Beiträge aus dem Gebiete der experimentellen Krebsforschung in monographischer Darstellung.

In Band 5 berichtet K. SYTÄÄ, Helsinki, über «Defective Cell Maturation, an Alternative to Accelerated Cell Division as Target for Cancer Therapy». Er zeigt dabei neue Wege für die Krebstherapie auf. W. E. POPE, Pittsburgh, Penna., versucht in seinem Beitrag «The Cause and Nature of Cancer» eine einheitliche Ursache der Krebsentstehung aufzudecken. Der Beitrag von F. BUCSORY und G. BAYKON, Santa Barbara, Calif. «Carcinogenesis Through Solid State Surfaces» betont die grosse Bedeutung der Oberflächen von kreberzeugenden Stoffen, die neben den chemischen Faktoren nicht vernachlässigt werden dürfen.

C. M. MARTIN, Jersey City N. J. berichtet über «Interactions of Hydrocarbon Carcinogens with Viruses and Nucleic Acids in vivo and in vitro». T. L. DAO, Buffalo, N. Y. gibt eine umfassende Darstellung über «Carcinogenesis of Mammary Gland in Rats» und hebt die Bedeutung des im Vergleich zum Mammarkarzinom der Maus nur wenig bearbeiteten Mammarkarzinomes der Ratte für die experimentelle Tumorforschung

bervor. Im Beitrag von B. A. RUMPHOLDT, Penna, «Carcinogen-Induced Tolerance to Homotransplantation» werden schließlich immunologische Krebsprobleme angeschnitten.

In Band 6 finden wir zuerst eine Arbeit von J. D. ALMEIDA UND A. W. HAY, Toronto, über «The Position of Oncogenic Viruses in a Classification of Viruses Based on Particle Morphology» in der versucht wird, den Begriff der onkogenen Viren morphologisch besser zu definieren. A. AJELRAD, Toronto, schreibt über «Antigenic Behaviour of Lymphoma Cell Populations in Mice as Revealed by the Spleen Colony Methods». Im nächsten Beitrag über «Effects of Anticancer Drugs on Biochemical Control Mechanisms» faßt J. F. HEDMANSOHN, Edmonton, Alberta, die Literatur über biochemische Kontrollmechanismen von Antimetaboliten zusammen. Im ausführlichen Beitrag von F. J. C. ROX UND MARGARET A. WALTERS über «Some Unsolved Problems in Lung Cancer Etiology» werden neue Aspekte zur Ätiologie des Lungenkrebes aufgereiht und die Kombinationen der Bronchialkrebs mit Cushing-Syndrom, Carcinoid-Syndrom, Hypercalcaemien, Myo- und Neuropathien diskutiert. Die beiden letzten Artikel von A. C. SANTORIELLI, New Haven, Conn., über «Approaches to the Combination Chemotherapy of Transplantable Neoplasms» und von H. O. SJÖBERG, Stockholm, über «Transplantation Methods as a Tool for Detection of Tumor-Specific Antigens» befassen sich mit immunologischen Problemen der experimentellen Tumorforschung.

Die meisten Beiträge bilden eine gelungene Synthese von Literaturüberzicht und eigenen Forschungsergebnissen der Autoren, wobei auch etwas Platz für spekulative Hypothesen bleibt. Die Aktualität der gewählten Themen steht außer Zweifel. So dürfen die «Progress in Tumor Research» weiterhin einen wichtigen Platz in der Bibliothek der an experimenteller Tumorforschung Interessierten einnehmen. F. GLOER, Basel

Ans der Medizinischen Universitätsklinik Kantonsspital Zurich
(Dir. Prof P. H. Rossmann)

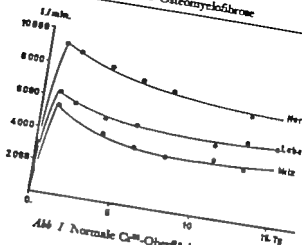
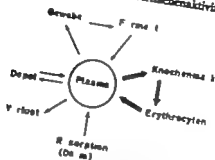
Die Osteomyelofibrose

Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom

Von H. E. BRUNNER

Das Osteomyelofibrose-Syndrom zeigt beim Vollbild *klinisch* die klassische Trias Heptasplenomegalie, Knochenmarksfibrose und erythromyeloidisches Blutbild. *Pathologisch-anatomisch* findet sich neben Reticulumzellwucherung und Myelofibrose bzw. Sklerose im Knochenmark eine myeloidische Metaplasie extramedullärer Organe, insbesondere der Leber und Milz (13 27 38 39). *Ätiologie* und *Pathogenese* sind unklar. Man betrachtet die Osteomyelofibrose als Krankheit sui generis oder als Endzustand myeloidischer Leukämien und der Polycythaemia vera. Die Diagnose kann auf Grund des klinischen Bildes vermutet werden. Ihre Bestätigung erfolgt durch den Nachweis von retikulärer Hyperplasie und Fibrose in der Biopsie und extramedullärer Erythropoese in der Nadelbiopsie von Milz und Leber. Durch *Isotopenuntersuchungen* mit radioaktivem Eisen und Chrom konnte das Verständnis der Ferro- und Erythrocytenkinetik beim Osteomyelofibrose-Syndrom wesentlich gefördert werden. Die quantitative Erfassung der Erythrocytenkinetik vermittelt wertvolle Informationen über Intensität und Ort des Erythrocytenabbaues. Die Prüfung der Ferrokinetik erlaubt den Eisenumsatz sowie Ausmass und Ort der Erythrocytenproduktion zu bestimmen. Gleichzeitig können Erythrocyten- Plasma und totales Blutvolumen exakt gemessen werden.

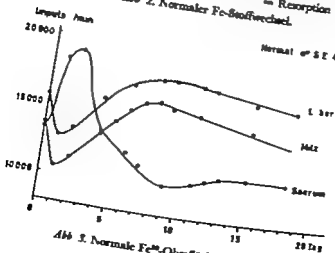
In Ergänzung unserer früheren Mitteilung (9) soll über weitere ferro- und erythrokinetische Untersuchungen bei Osteomyelofibrosen berichtet werden.

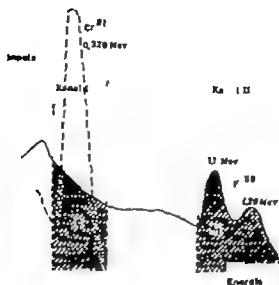
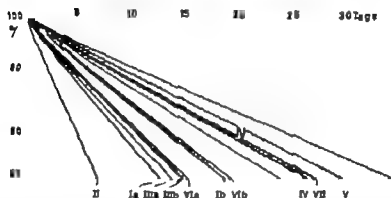
Abb. 1 Normale Cr^{51} -Oberflächenaktivitäten

Plasma-F Turnover = 30 mg/24 h
 27 mg/24 h = Erythropoese
 1 mg/24 h = Gewebe
 1 mg/24 h = Depot
 1 mg/24 h = Verlust
 = Resorption

Abb. 2. Normaler Fe-Stoffwechsel.

Normal of S.E. 43)

Abb. 3. Normale Fe^{59} -Oberflächenaktivitäten.

Abb. 4 Fe⁵⁹/Cr⁵¹-Gamma-Spektrum.Abb. 5. Osteomyelofibrose: T_{1/2}-Cr⁵¹

HODGES-JONES *et al.* (29) beziehen Herz- und Milchaktivität auf 1000 Herzimpulse und berechnen die sog. zusätzliche Aktivität (*excess counts*) in Leber und Milz. Aus einfachem ist jedoch die Verwendung des Milz/Leber-Quotienten (30) d. h. des Quotienten der absoluten Meßwerte der Leber zur Milz. Er liegt normalerweise um 1. Bei Hämolyse in der Milz steigt er über 1, bei Hämolyse in der Leber fällt er unter 1 (Abb. 6, 7). Schwierig wird die Interpretation wenn Hämolyse in beiden Organen erfolgt. Eine intravasale Hämolyse wird durch Oberflächenmessungen nicht erfaßt.

Durchführung. Gleichzeitig mit den Blutentnahmen wird die Radioaktivität über Herz (3. ICR parasternal Link) Leber und Milz (Interskote perikardische Dorsalflex) gemessen. Berechnung der Milz/Leber-Quotienten und Graphik der Werte in ein koordinatensystem.

Normalbereich 0,5 - 1,5 (Abb. 6, 7).

3. Die Untersuchung der Ferritinik mit Fe^{59}

Die Untersuchung der Ferritinik mit radioaktivem Eisen wurde 1950 von Herr *et al.* (78) eingeführt und ist seither von zahlreichen Forschern ausgebaut worden (Lk. s. 7, 8, 10). Sie umfaßt die Bestimmung des Plasmacheisenumsatzes, des Radioeisenabbaus in die Erythrocyten und der Eisenverteilung im Organismus.

a) Die Bestimmung des Plasmacheisenumsatzes und des Plasmavolumens

Prinzip. Das gesamte Körperereisen ist in dauerndem Umsatz begriffen, wobei der Plasmacheisenspiegel mit 100 gamma-% konstant gehalten wird (Abb. 2). Dies bedingt, daß die ins Plasma einströmende Eisenmenge immer gleich der abströmenden sein muß. Der Plasmacheisenumsatz (PET) erfolgt proportional der Plasmacheisenkonzentration (PE), dem Plasmavolumen (PV) und umgekehrt proportional der Eisenabwanderungsgeschwindigkeit aus dem Plasma. Die Eisenabwanderung aus dem Plasma folgt in erster Annäherung einer Exponentialfunktion, d. h. einer Geraden im semi-logarithmischen Koordinatensystem. Als Maß der Abwanderungsgeschwindigkeit dient die effektive Halbwertszeit des Plasmacheisens ($T_{1/2}^{\text{eff}}$). Sie ist definiert als der Zeitraum bis die Hälfte einer Eisenmenge (A) abgewandert ist. Durch Extrapolation der Geraden nach der Zeit Null läßt sich eine virtuelle F 39-Aufgangskonzentration im Plasma bestimmen (T_0) und das Plasmavolumen nach dem Verdünnungsprinzip aus der applizierten Fe^{59} -Aktivität (A) berechnen ($PV = A/T_0$). Der Plasmacheisenumsatz berechnet sich nach folgender Formel:

$$PET = 0,693 \frac{PE \cdot PV}{T_{1/2}^{\text{eff}}} \quad 0,693 \text{ natürlicher Log von 2}$$

Als Dimension wählt man mg Eisen pro Tag oder mg Eisen pro Tag und pro kg Körpergewicht. Nach intravenöser Applikation von mit radioaktivem Eisen markiertem Plasma (Transferrin) lassen sich Plasmavolumen und $T_{1/2}^{\text{eff}}$ bestimmen. Normalerweise beträgt $T_{1/2}^{\text{eff}}$ 60–90 Minuten (Abb. 8) und der Plasmacheisenumsatz 30 mg pro Tag d. h. das gesamte Plasmacheisen von 3–4 mg wird innerhalb 4 Stunden schnell umgewirbt. Aus Plasmacheisenumsatz, Erythrocytenvolumen, Lebensdauer der Erythrocyten und Eisengehalt des Hämoglobins (1 ml Erythrocyten enthält 1 mg Eisen) läßt sich die effektive Erythropoese (E) d. h. die für die Erythrocytenproduktion benötigte Eisenmenge berechnen. Den restlichen Anteil des Plasmacheisenumsatzes bezeichnet man als ineffektive Erythropoese (IE).

$$\frac{EV_{\text{ml}}}{MELD_{\text{Tag}}} = cE_{\text{mlEg/Tag}} = cE_{\text{mg Fe/Tag}}$$

$$PET_{\text{mg Fe/Tag}} - cE_{\text{mg Fe/Tag}} = IE_{\text{mg Fe/Tag}}$$

Unter normalen Verhältnissen beträgt der Nicht-Erythropoese Eisenumsatz 30–50% des gesamten Plasmacheisenumsatzes.

Blutanalyse und Plasmamarkierung. Punktion von 50 ml coadem Blut in 10 ml ACD-Lösung enthaltende «Biotest»-Flaschen. Zentrifugation während 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Separieren des Plasmas und Zugabe von 10 $\mu\text{C } Fe^{59}$ Citrat (Fa. Abbott, Chicago spec. Aktivität 0,1 mC/ml). Inkubation während 30 Minuten bei Zimmertemperatur.

Plasmacrytitan und Blutanalyse. Herstellung einer Standard-Lösung des markierten Plasmas. Intravenöse Injektion von 10 ml markierten Plasmas mit präinjiziert-volumengerechter Spritze. Punktion von je 10 ml Venenblut in 15-minütigen Intervallen während der ersten Stunde nach Applikation des Fe^{59} Hämatokritbestimmung aus der

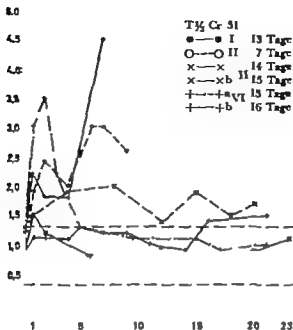


Abb. 6. Osteomyelofibrose: Milch-Leber-Quotienten mit Haemolyse in der Milch.

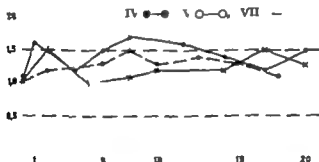


Abb. 7. Osteomyelofibrose: Milch-Leber-Quotienten ohne Haemolyse

ersten Blutprobe. Zentrifugation aller 4 Blutproben während je 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute.

Separieren des Plasma.

Messungen und Berechnungen: Messung der Plasmaaktivitäten (PA imp/min/ml). Der Verlauf der Impulszahlen pro ml gegen die Zeit in ein schiefes Koordinatensystem. Es ergibt sich eine Gerade, mit welcher $\text{Ti}_{1/2-\text{Fe}^{59}}$ und die virtuelle Fe^{59} -Anfangskonzentration pro ml Plasma (T_0) graphisch ermittelt werden kann. Berechnung der gesamten injizierten Aktivität (A) aus der spezifischen Aktivität der Standardlösung () und dem injizierten Volumen markierten Plasma (v) ($A_{\text{imp/min}} = \text{imp/min/ml} \cdot \text{ml}$). Berechnung des Plasmavolumens nach dem Verdünnungsprinzip aus T und A. Berechnung des Plasmaschwundmastes. Berechnung der effektiven und ineffektiven Erythropoese (CE bzw. IE).

2. Resultate des Radioisotopstudiums

Bei 7 Patienten (III – IX) konnte die Ferrokinetik gemessen werden in den Fällen III und VI durch zweimalige Untersuchung.

a) *Plasmaeisenumsatzrate Plasmaschwund und Plasmenormalsatz.* $T^{59}\text{-Fe}^{59}$ war immer verkürzt (Tab. III, Abb. 8), die Plasmavolumina normal oder entsprechend der Verminderung des Erythrocytenvolumens erhöht (Tab. III) 6mal (IIIa, IV V VI VIII, IX) war der Plasmaeisenumsatz gesteigert und 1mal (VII) normal. In 2 Fällen (III, VII) erfolgte der Eisenumsatz proportional der Erythropoese und war der ineffektive Eisenumsatz nicht vermehrt (Tab. III). Die Fälle IV V und VI zeichneten sich durch eine gesteigerte ineffektive Erythropoese aus.

b) *Radioisotop in der Erythrozyte.* Der Fe^{59} Einbau erfolgte bei 3 Fällen (V VII, IX) normal, in 4 (IIIa, IV VIa, VIII) deutlich vermindert und war in 2 Fällen (IIIb, VIb) praktisch aufgehoben (Abb. 9 Tab. III).

c) *Fe^{59} Aktivität an der Körperoberfläche.* Der Verlauf der Oberflächenkurven über Mili und Sacrum war immer pathologisch, über der Leber unauffällig. In allen Fällen bestand extramedulläre

Tab. I

Klinische Befunde bei 9 Fällen von Osteomyelose (EV Erythrocytenvolumen PI Plasmavolumen ME. mittlerer Plasmaschwund, LEK. Leber Eisenbindungskapazität; T Eisenbindungsplasma)

Nr.	Case	EV	PI	ME	LEK	T	EV	PI	ME	LEK	T
		%	l/min	g	g	g	ml	ml	ml	ml	ml
	H.B.	8	3.3	33							
		9	—	8							
	W.P.	—	1.9	34							
	S.K.	10	5	—	1.9	620	1	2910	32	3980	64
					14.4	620	1	4740	70	4715	72
	I.A.	13.1	3.0	32	41.4	1635	—	2220	40	3990	67
	P.P.	1.8	4.1	—	37.8	1328	29	2800	34	4575	—
	G.J.	11	2.9	33	29	1430	15	3290	41	4270	41
		6	—	—	15.3	885	13	5220	73	3305	—
	S.F.	11.0	—	29	—	1710	19	2380	36	3520	73
	C.R.	—	3.5	3	—	1360	25	3160	23	4320	77
	D.S.	9.8	4.6	18	33.1	1700	25	3680	5	570	77
	Summe	—	—	—	44	1771	28	2333	41	3256	70

Durchführung Grundsätzlich ist das simultane Radioeisen/Radiochromstudium eine Kombination der beschriebenen Einzelverfahren. Punktion von 50 ml Venenblut in 15 ml ACD-Lösung enthaltende «Biotest Flaschen» Zentrifugation während 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Separieren von 15 ml Plasma und Markierung mit $20 \mu\text{C Fe}^{59}$ Markierung der konzentrierten Erythrocyten mit $100 \mu\text{C Cr}^{51}$ Injektion der markierten Erythrocyten. Nach 30 Minuten Punktion von 10 ml Venenblut zur Erythrocytenvolumenbestimmung. Gleichzeitig Injektion des mit Fe^{59} markierten Plasmas. Bestimmung von Erythrocytenwanderungsgeschwindigkeit aus dem Plasma, Plasmavolumen, Plasmachromatizität, Eiseneinbau in die Erythrocyten, Halbwertszeit des Erythrocytenchroms und Messung der Fe^{59} und Cr^{51} Aktivitäten an der Körperoberfläche.

Normalwerte a. S. S.

$\text{EV}_{\text{Cr}} = 950 - 2800 \text{ ml bzw } 26 - 32 \text{ ml/kg}$, im Mittel $1701 \text{ ml bzw } 28 \text{ ml/kg}$.
(Tab. I und II)

Ergebnisse

1 Resultate des Radiochromstudiums

a) *Erythrocytenvolumen (Tab. I)* Das Erythrocytenvolumen wurde in 7 Fällen bestimmt. Es war entsprechend dem tiefen Hämoglobinwert bei 5 Fällen (III VI VII VIII IX) vermindert und in 2 (IV V) normal.

b) *Halbwertszeit des Erythrocytenchroms (Tab. III Abb. 5)* Bei 7 der 9 untersuchten Patienten konnte $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ bestimmt werden. 3 (IV V VII) wiesen eine normale $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ auf, bei 3 (I III VI) lag $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ zwischen 10 und 20 Tagen und nur in 1 Fall (II) unter 10 Tagen.

c) *Die Cr^{51} Aktivität an der Körperoberfläche* konnte bei 7 Kranken (I-VII) gemessen und die Milz/Leber-Quotienten berechnet werden (Tab. III). Sie waren bei allen Patienten mit verkürzter $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ (I II III VI) pathologisch (Abb. 6) bei den Fällen mit normaler $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ (IV V VII) zwischen 10 und 16 (Abb. 7). Alle Patienten wiesen eine Splenomegalie auf. In 4 Fällen (I, II, IIIb, VIa) sprechen die Milz/Leber-Quotienten zwischen 17 und 47 für Hämolyse in der Milz, in 2 Fällen (IIIa, VIb) ist der Milz/Leber Quotient trotz stark verkürzter $\text{T}_{1/2}\text{-Cr}^{51}$ von 14 bzw 19 Tagen im Bereich der Norm, obwohl eine erste Untersuchung (VIa) auf Hämolyse in der Milz hinwies. Für Hämolyse in der Leber fanden sich in unserem Krankengut keine Anhaltspunkte. Von Bedeutung für die Lokalisierung der Hämolyse ist ein pathologischer Milz/Leber Quotient über einen längeren Zeitraum. Dies trifft für die Fälle I II und IIIb zu.

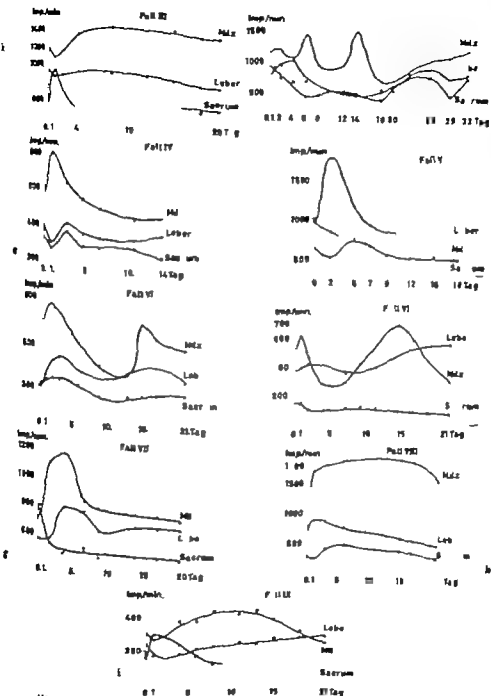


Abb. 20 Fem-Oberflächenkurven: a) Fall IIIa, b) Fall IIIb, c) Fall IV d) Fall V
e) Fall VIa, f) Fall VIb, g) Fall VII h) Fall VIII i) Fall IX

2 Resultate des Radioisotopiuntersuchungs

Bei 7 Patienten (III – IV) konnte die Ferrokinetik gemessen werden in den Fällen III und VI durch zweimalige Untersuchung.

a) *Plasmaeisen clearance Plasmavolumen und Plasmaeisenumsatz.* $T_{1/2}\text{-Fe}^{59}$ war immer verkürzt (Tab. III, Abb. 8) die Plasmavolumina normal oder entsprechend der Verminderung des Erythrocytenvolumens erhöht (Tab. III) 6mal (IIIa, IV V VI, VIII, IX) war der Plasmaeisenumsatz gesteigert und 1mal (VII) normal. In 2 Fällen (III VII) erfolgte der Eisenumsatz proportional der Erythropoese und war der ineffektive Eisenumsatz nicht vermehrt (Tab. III) Die Fälle IV V und VI zeichneten sich durch eine gesteigerte ineffektive Erythropoese aus.

b) *Radioisotopeneinbau in die Erythrocyten.* Der Fe^{59} Einbau erfolgte bei 3 Fällen (V VII, IX) normal, in 4 (IIIa, IV VIa, VIII) deutlich vermindert und war in 2 Fällen (IIIb, VIb) praktisch aufgehoben (Abb. 9 Tab. III)

c) *Fe^{59} Aktivität an der Körperoberfläche.* Der Verlauf der Oberflächenkurven über Litz und Sacrum war immer pathologisch über der Leber unauffällig. In allen Fällen bestand extramedulläre

Tabell 1

hämatologische Befunde bei 9 Fällen von Osteomyelofibrose (EV Erythrocytenvolumen; PV / totales Blutvolumen ME manifestes Plasmareich LEBK: Lebere Eisenbindungskapazität; EBE: Eisenbindungskapazität)

Fall	Name	Hb g%	Ec $10^9/\text{mm}^3$	Ret 10^9	Hätkorr %	EV ml/kg	PV ml/kg	TV ml/kg	ME %			
a	H.B. ♀	8	3,3	33								
		9	2,8	8								
	W.P. ♀	7,7	1,9	54								
b	S.K. ♂	10,2	3,2	23	18,9	680	12	2910	52	3390	54	125
					14,4	680	17	4040	70	4715	82	250
	I.A. ♀	14,1	5,0	32	41,4	1605	27	2990	40	3295	67	70
	P.P. ♀	12,8	4,1	22	37,8	1395	29	2900	34	4575	83	85
	G.J. ♀	11,2	3,9	33	29,7	1430	18	3390	43	4820	61	90
b		6,7	2,3	7	15,3	885	13	5070	73	3305	88	180
	S.F. ♀	11,0		29	27	1000	19	2890	36	3230	75	22
	C.R. ♂	7,2	3,3	20	27	1360	23	3160	23	4520	77	50
c	D.S. ♂	9,8	4,6	18	33,1	1710	25	3660	52	5370	77	45
	höhere normalwerte*	—	—	—	44	1701	28	2535	42	3236	70	102

Erythropoese in der Milz. Die Interpretation des Kurvenbildes bereitet oft Schwierigkeiten. Einfach liegen die Verhältnisse in den Fällen IV V VII und VIII. Sie zeigen eine typische Erythropoese kurve über der Milz, wie sie normalerweise über dem Sacrum registriert werden kann, und fehlende Aktivität über dem Knochen mark (Abb. 10). Sehr instruktiv sind die 2gipfligen Milzkurven in den Fällen IIIb VIa, VIb (Abb. 10e, f). Der zweite Gipfel ist durch Reaktivisation des durch Hämolysen vorzeitig freigeordneten Fe^{59} bedingt. Das 2. Maximum der Milzaktivität korreliert mit der verknöcherten $\text{T}^{51}\text{-Cr}^{51}$. Auch diesen Fällen fehlt die erythropoetische Knochenmarkaktivität vollständig.

Tabelle II

Halbwertszeit des Erythrocytenchroms ($\text{T}^{51}\text{-Cr}^{51}$) und mittlere Lebensdauer der Erythrocyten (MELD) nach Doornix *et al.* (17)

$\text{T}^{51}\text{-Cr}^{51}$ Tage	MELD Tage	Destruktionsrate (1 = normal)
1	1,5	82
2	3	40
3	4,5	26
4	6,3	19
5	8	15
6	10	12
7	12	10,1
8	14	8,6
9	16	7,5
10	18	6,6
11	21	5,8
12	23	5,2
13	26	4,6
14	29	4,2
15	32	3,8
16	35	3,4
17	38,5	3,1
18	42	2,8
19	46	2,6
20	50	2,4
21	54	
22	60	
23	66	
24	72	
25	77	
26	86	Nicht mehr streng
III	93	richtig, weil
28	102	Datum keine
29	112	Exponentialfunktion
30	120	sehr

Tabelle III

Ferro- und Erythrocytenkinetik bei 9 Fällen von Osteomyelofibrose

Fall N	T _{1/2} -F min.	PET		ICR %/Tg	MELD	
		mg/Fe/Tgg	mg/Fe/Tg/kg		T _{1/2} G	MELD G
I	—	—	—	—	18	26
Ib	—	—	—	—	19	46
II	—	—	—	—	7	17
III	16	52,4	0,9	40/12	14	29
IIIb	30	32,2	0,6	3/7	15	32
IV	16	100,0	1,7	56/14	27	120
V	48	50,5	0,9	97/15	30	120
VI	32	81,6	1,0	63/15	15	12
VII	38	228,1	3,3	4/10	10	46
VII	32	19,0	0,4	97/16	27	120
VIII	36	42,2	0,7	40/5	—	—
IX	19	83,2	1,1	100/15	—	—
	56—93	22—50	0,55—0,74	73—99	24—35	120
Normalwerte	71	36	0,6	88/10	30	

Diskussion

Wesentliche Ursache der Anämie bei Osteomyelofibrose ist die verkürzte Erythrocytenlebensdauer. Bei unseren 7 mit Cr⁵¹ untersuchten Fällen bestand viermal deutliche Hämolyse. Am gesteigerten Erythrocytenabbau spielt — abgesehen von der minderwertigen Konstitution der Erythrocyten — auch die Splenomegalie im Sinne des Hypersplenismus eine Rolle (31 42 43). Trotz Splenomegalie kann aber die Lebensdauer in vereinzelt Fällen normal sein (IV V VII). Die Hämolyse erfolgt in Milz, Leber oder in beiden Organen zugleich. Ihre Lokalisierung durch Messung der oberflächlichen Chromaktivität bereitet infolge der großen Fehlerbreite der Methode erhebliche Schwierigkeiten. In allen unsern Fällen mit verkürzter Lebensdauer der Erythrocyten fand sich ein pathologischer Milz/Leber Quotient entsprechend einer Hämolyse in der Milz. Vermehrten Erythrocytenabbau in der Leber konnten wir nie nachweisen.

Die zweite Komponente der Anämie ist die verminderte Erythropoese. Dies geht aus dem meist herabgesetzten und nur selten normalen (V VII IX) Radioeisenanbau in die Erythrocyten hervor. Der Anstieg der Inkorporationskurve erfolgt verzögert (Abb. 9) und fällt vorzeitig entsprechend der verkürzten Lebensdauer der Erythrocyten wieder ab. Trotzdem ist der gesamte Plasmaseisengehalt normal oder sogar gesteigert bei beschleunigter Eisenabwanderung.

Tabelle III Fortsetzung

Eff. Erythropoese mg/100 l	Ineff. Erythrop. mg/100 l	Milz/Leber Quotient Cr^{51}	Erythropoese (Cr^{51})			Spinnen- webgabe
			Knochenmark	Milz	Leber	
—	—	2,0—4,7	—	—	—	+
—	—	—	—	—	—	+
—	—	2,1—3,3	—	—	—	+
21,4	29	1,0—1,7	++	+	—	+
21,3	10,9	1,7—2,1	—	+++	—	+
13,4	66,6	1,2—1,6	—	+++	—	+
13,3	37,2	1,1—1,5	—	+++	—	+
44,7	36,9	1,1—3,7	—	+++	—	+
19,3	208,8	1,1—1,7	—	+++	—	+
6,3	10,7	1,0—1,5	—	+++	—	+
—	—	—	—	+++	—	+
—	—	—	++	+	—	+
8—23	6—33	0,5—1,6	+++	—	—	—
14	21					

aus dem Plasma. Er liegt daher über dem für die Erythropoese erforderlichen Bedarf und ist zum grossen Teil ineffektiv. Nur einmal (IIIb) fehlte in unserem Krankengut diese Diskrepanz zwischen gesamtem Plasmaeisengehalt und effektiver Erythropoese. Auch andere Autoren beobachten diese ineffektive Erythropoese (26, 36, 43). Ihre Pathogenese ist schwer verständlich. Eine mögliche Erklärung wäre Abbau der Erythroblasten bereits im Knochenmark bzw. den extramedullären Blutbildungsherden. Nur ein Teil der Erythroblasten könnte ausreifen und ausschweimen. Gegen diese Hypothese spricht aber der «Eisenleerlauf» bei normaler Erythrocytenlebensdauer (IV, V, VII) und die meist normalen oder sogar erhöhten Reticulocytenwerte. Diese Diskrepanz zwischen verminderter effektiver Erythropoese und normaler bzw. vermehrter Reticulocytenzahl wird durch Annahme zweier Erythrocytenpopulationen erklärbar. Eine kurzlebige würde innerhalb Stunden nach Ausschweimung hämolysiert, während die zweite Population eine längere oder sogar normale Lebensdauer aufwiese. Der Begriff der ineffektiven Erythropoese würde definitionsgemäss die kurzlebige Erythrocytenpopulation erfassen (24). Eine Korrelation zwischen unreifen Erythroblasten im peripheren Blut und ineffektiver Erythropoese besteht nicht (43). Eine weitere Deutung der ineffektiven Erythropoese wäre vermehrter Eisenaustausch zwischen Plasma und Depotorganen, vor allem Speicherung von Radioeisen ohne Utilisation in der vergrößerten Milz als Folge des vermehrten

Blut bzw. Plasmagehaltes. Durch Splenektomie unmittelbar nach der Tracerapplikation konnten aber HAURAKI *et al.* (26) diesen Mechanismus ausschließen. Gegen eine vermehrte Eisenabwanderung in die Leber spricht in unseren Fällen die unauffällige oberflächliche Fe^{59} Aktivität.

Die extramedulläre Erythropoese kann durch Messung der oberflächlichen Fe^{59} Aktivität nachgewiesen werden. Meist – wie auch in unseren Fällen – erfolgt sie in der Milz. Andere Autoren stellten sie auch in der Leber fest. Die mehr oder weniger ausgeprägte bis fehlende Eisenaktivität über dem Sacrum zeigt das Ausmaß der Rest Erythropoese im Knochenmark (IIIa, IX). Hervorgehoben seien unsere beiden Fälle (IIIb–VI) mit 2gipfliger Erythropoese-Kurve über der Milz als Ausdruck einer Reutilisation des aus der Hämolyse frei gewordenen Fe^{59} . Die Milzkurve kann auch einen plateauartigen Verlauf nehmen (VIII–IX), das aus dem Erythrocytenabbau befreite Eisen wird nicht mehr vollständig reinkorporiert.

Unsere Resultate der kombinierten Radioisoten-/Radiochrom-Untersuchung bei Osteomyelofibrose korrelieren mit denjenigen anderer Autoren (2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47).

Kann auf Grund der oberflächlichen Eisenaktivität die Erythropoese in die Milz lokalisiert werden, ist selbstverständlich eine Splenektomie oder eine Strahlenbehandlung der Milz kontraindiziert. Fehlt eine lienale Erythropoese oder weist die oberflächliche Chromaktivität auf intensive Hämolyse hin, steht einer Splenektomie nichts im Wege. Diese Indikation ist auch gegeben, wenn die Erythropoese ausschließlich oder vorwiegend in der Leber stattfindet. Die Isotopenuntersuchungen mit Fe^{59} und Cr^{51} ergeben heute eine Erklärung für den empirisch bekannten unterschiedlichen Erfolg einer Splenektomie bei Osteomyelofibrosen.

Einer besonderen Besprechung bedürfen unsere Fälle II und I. Der Hämoglobinbedarf kann durch die extramedulläre Erythropoese weitgehend gedeckt werden und die Erythrocytenlebensdauer ist normal. Der Eisenumsatz ist weit über den für die Erythropoese erforderlichen Bedarf gesteigert. Dieses Zusammentreffen einer normalen Lebensdauer der Erythrocyten mit »Eisenleerlauf« beobachten wir auch bei Polycythaemia vera (6, 11). Die Möglichkeit einer Differenzierung des Osteomyelofibrose-Syndroms, vor

allen eine Abgrenzung der aus Polycythämien hervorgegangenen Fälle wäre bedeutungsvoll. Schwierig zu interpretieren sind die Befunde im Fall VII. Trotz Anämie besteht die Kombination von normaler Erythropoese (normaler Radioeiseneinbau, mäßige Retikulozytose) ohne Hämolyse (normale $T^{59}Cr^{51}$). In den übrigen Fällen kann die hämolytische Komponente der Anämie trotz gesteigerter Erythropoese nicht kompensiert werden. Der verminderte Radioeiseneinbau ist Ausdruck der Hämolyse.

Radioeisen und Radiochromstudium haben das pathogenetische Verständnis der Osteomyelofibrose wesentlich gefördert. Die Anämie resultiert aus Hämolyse, verminderter Erythropoese oder Kombination dieser beiden Mechanismen. Die Erythropoese ist normal oder meist gesteigert, erfolgt jedoch zu einem großen Teil ineffektiv und genügt nicht zur Gewährleistung eines normalen Erythrocytenvolumens oder Kompensation einer Hämolyse. Die Ursache des «Eisenleerlaufs» ist unklar. Theoretisch kann er durch vorzeitigen Abbau der Erythroblasten an den medullären und extramedullären Produktionsstätten, eine kurzlebige Erythrocytenpopulation oder einen gesteigerten Eisenaustausch zwischen Plasma und Depotorganen erklärt werden. Die Erythropoese erfolgt medullär, extramedullär oder an beiden Orten zugleich. Meist ist im Ablauf der Erkrankung ein allmähliches Verschwinden der medullären und Einspringen der extramedullären Erythropoese zu beobachten. Erst terminal bricht auch die extramedulläre Blutbildung zusammen. Der Erythrocyten-Abbau erfolgt normal oder meist gesteigert. Die Hämolyse dürfte sowohl durch die Produktion minderwertiger Erythrocyten als auch sekundär durch den Hyperplemsmus bedingt sein. Durch Messung der oberflächlichen Chromaktivität kann die Hämolyse in Leber und Milz lokalisiert werden, sie kann aber auch intravasal erfolgen. Es gibt Fälle (IV, V) mit genügender, meist vollkommen extramedullärer Erythropoese ohne gesteigerte Erythrocytendestruktion und mit extrem gesteigertem «Eisenleerlauf», welche erst sehr spät eine Anämie entwickeln. Möglicherweise handelt es sich dabei um Fälle von Polycythæmia vera mit allmählichem Übergang in Osteomyelofibrose.

Die Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik bei Osteomyelofibrose erlaubt, das Ausmaß einer Hämolyse und die Erythropoese zu erfassen, die Indikation zur Splenektomie zu stellen und das Osteomyelofibrose-Syndrom pathogenetisch zu differenzieren.

25. GRAY S. AND STERLING, K.: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J. clin. Invest.* 29: 1604 (1950)
26. HACHIMI, F. I. AND TOSANTINI, L. M.: Ineffective erythropoiesis. *Amer. J. Med.* 31: 519 (1961)
27. HUECK, G.: Zwei Fälle von Leukämie mit eigentümlichem Blut- resp. Knochenmarksbefund. *Virchow Arch.* 78: 475 (1879)
28. HOFF R. L. HENNEY L. G. AUSTIN, R. E. GARCIA, J. F.; ROBERTS, R. M. AND LAWRENCE, J. H. Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoietic disorders. *J. clin. Invest.* 29/17: 1041 (1950).
29. HUOTTA-JOKI, N. C. AND SZUR, L. Determination of sites of red cell destruction using Cr^{51} -labeled cells. *Brit. J. Haemat.* 3: 320 (1957)
30. JAYDI, J. H. GREENBERG, M. S.; YOSHIKOTO, R. H. AND CASTLE, W. B. Clinical determination of the sites of red cell destruction. *J. clin. Invest.* 34: 390 (1955).
31. KENDERLINO W. REIFNER, L. DUCHLER, W. UND HOFFMAJER, G. Klinische Studien über die Kinetik des Eisens. *Nuclear Med. Z. Suppl.* 1: 81 (1963)
32. LOER, V. MOORE, C. V. AND DUBACH, R. The physiologic evaluation and management of chronic bone marrow failure. *Amer. J. Med.* 15: 499 (1953)
33. LEDER, E. M. AND BARTER, C. F. Some clinical applications of techniques with tracer doses of Fe^{59} . Radiosotope Conference 1954 (Johnston, London 1954).
34. MIEDEB, H. L. BOSSON, M.; PADILLA, C. ORRISTON, D.; TURIANA, M. I. BOONER, J. Contribution à l'étude physiopathologique des splénomégalies myéloïdiques avec myélofibrose. *Rév. Hémat.* 12: 445 (1957)
35. NATTAU, D. G. AND BERLIN, N. I. Studies of the production and life span of erythrocytes in myeloid metaplasia. *Blood* 14: 668 (1959)
36. OSTROFF, H. F. UND PRINELL, W. Die Erythrokinetik bei Osteomyelofibrose. (Untersuchung über die Produktion und Destruktion der Erythrocyten mit Cr^{51} und Fe^{59}) *Klin. Wochs.* 42: 483 (1964)
37. POLYCOV, M. Ferokinetics techniques in KENDERLINO Eisenstoffwechsel (Thieme Stuttgart 1960)
38. ROER, K. Myelofibrose und Osteomyelofibrose. *Acta haemat.* 15: 209 (1956).
39. ROER, K. Das menschliche Knochenmark (Thieme, Stuttgart 1960).
40. SCHAFFA, G. ET DREYER, J. C. Physiopathologie de l'hémoglobine et du globe rouge étudiée à l'aide du fer radioactif. *Sang* 24: 142 (1953).
41. SCHWARTZ, L. WASSERMAN, R. L.; STARKEY, L. TENDLER, D. AND LADMAN, L. Observations on extramedullary hematopoiesis in myelofibrosis using radioactive techniques. *Proc. 6th Congr. Int. Soc. Hematol. Boston, 1956* (Grune & Stratton, New York 1958)
42. STRINZA, M. M. DUGAN, A. TAYLOR, L.; STRINZA, P. V. AND BOBERT D. Splenectomy in leukaemia and myelofibrosis. *Amer. J. clin. Path.* 37: 491 (1967).
43. SZUR, L. AND SMITH M. D. Red-cell production and destruction in myelofibrosis. *Brit. J. Haemat.* 7: 147 (1961).
44. VENTURA, S. MARINONI, V. Impiego clinico del Fe^{59} quale mezzo di indagine ematologica del ricambio del ferro. *Min. Nucl.* 1: 74 (1954)
45. WASSERMAN, L. R. RABIKOFF, I. A. LEAVITT D.; MAYER, J. AND FORT S. The rate of removal of radioactive iron from the plasma. An index of erythropoiesis. *J. clin. Invest.* 31: 32 (1952)
46. WEINSTEIN, I. M. AND BEUTLER, E. The use of Cr^{51} and Fe^{59} in combined procedure to study production and destruction in normal human subjects and in patients with haemolytic or plastic anemia. *J. Lab. clin. Med.* 65: 616 (1953).
47. WETTERLEY-MEIN, G. AND HUTT M. S. R. Radioactive iron studies in routine Haematological Practice. *Brit. med. J.* 1: 1445 (1956).

Institut de Clinique médicale et de Thérapie médicale de l'université
(Directeur Prof. Paolo Introzzi)

Altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans myélose érythrémique aiguë

Par P. INTROZZI, L. BUSCARINI ET ANTONIA NOTARIO

Qu'on a eu une description de la myélose érythrémique aiguë fut décrite pour la première fois en 1926 par GIOVANNI DI GIOIELLO (11) qui depuis 1917 (10) avait fait remarquer la possibilité d'une atteinte maligne de la série érythroblastique. Tous les cas de la littérature témoignent d'une rareté relative de cette forme (260 sujets environs) bien qu'ils comportaient à illustrer cette maladie il y a de nombreux problèmes dignes d'être éclaircis.

Nous ne voulons pas discuter la position nosologique controversée de la myélose érythrémique aiguë (selon quelques uns c'est une maladie autonome, un syndrome polyphasique avec une inévitable participation de la série blanche selon les autres). Nous voulons plutôt montrer quelques aspects de la biologie de la série rouge, jusqu'à maintenant mal connus ou encore ignorés, et relater les résultats tirés d'un cas d'érythrémie aiguë avec des altérations morphologiques et métaboliques significatives des érythroblastes et des érythrocytes.

Altérations érythroblastiques

Une grande quantité d'anomalies morphologiques et évolutives de l'érythroblaste érythrémique ont souligné par plusieurs auteurs BRAYARDELLI et coll. (3) ont reconnu une réduction évidente du rythme prolifératif, avec un dérèglement de la production homo- et hétéroplastique. L'incorporation exagérée du ^{32}P ou de l'isotope ^{3}H dans le noyau de l'érythroblaste érythrémique est une preuve de ce phénomène (16, 14). En particulier on observe une incapacité des érythroblastes de sécréter (11) ce phénomène pourrait être attribué selon BALDI et coll. (2) à une erreur d'absorption de la vitamine B_{12} . Les auteurs décrivent dans leurs sujets une association de mégakaryoblastose et des taux élevés de vitamines B_{12} dans le sérum. Cette interprétation est en contraste, néanmoins avec la notion que la mégakaryoblastose est très variable dans la

maladie érythémique et se les données d'autres auteurs (13) qui ont trouvé un métabolisme normal de la vitamine B₁₂ ou bien une concentration réduite dans le sérum (15). En outre Brum et coll. (9) ont démontré que le mégalo-blaste érythémique survivant *in vitro* n'est pas normalisé par la vitamine B₁₂, de l'acide folique et de l'acide folinique, qui accentuent presque d'une manière paradoxale ses caractéristiques anormales. Des altérations profondes du métabolisme protéique semblent avoir été soulignées par l'incorporation peu abondante de méthionine ³⁵S (16) et par la forte augmentation de la leucine LD-³H (14).

On doit juger comme manifestation anormale du biochimisme cellulaire la présence du matériel ³⁵S-pontif dans le cytoplasme (2, 26, 13), qui aurait formé par du glycogène (absence de la positivité au PAS dans les frotteux préalablement soumis à la digestion par l'amilase).

Les études sur les ultrastructures de l'érythroblaste érythémique de Gerson et Grousewo (12) ont démontré le phénomène de accumulation du cytoplasme, une quantité anormale de fermette et une diminution du nombre des mitochondries. La dernière donnée n'a pas été confirmée par Brum (5).

Le cas de myélome érythémique aigüe que nous avons examiné, démontre dans la moelle une évidente hyperplasie de la série érythroblastique et un nombre bien élevé des phases de maturation moins avancées. Il en résulte que l'activité mitotique érythroblastique atteint les limites au dessous de la norme. On remarque même la tendance des mitoses érythroblastiques au blocage en métaphase.

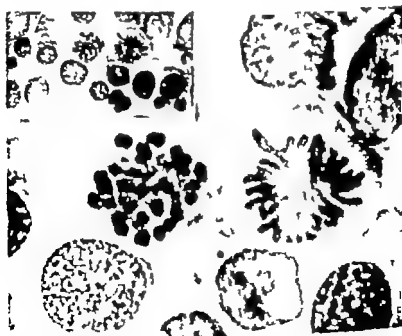


Fig. 1. Transformation érythroblastique médullaire avec des anomalies mitotiques. Contraction des chromosomes à forme de balles.

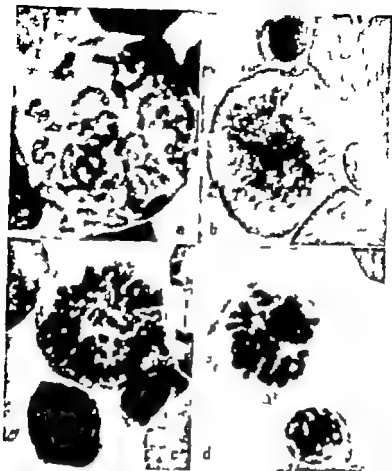


Fig 2 Exemple d'anomalies mitotiques des érythroblastes a) métaphase irrégulière b) schéma bipolaire c) contraction des chromosomes d) conglutination des chromosomes.

Les éléments érythroblastiques montrent de nombreuses atypies la présence de proérythroblastes à dérivation directe des cellules histiocytaïres, avec une lignée irrégulière du cytoplasme des altérations des figures mitotiques (unorienté metaphase) la conglutination des chromosomes dans la phase du monastère (balle metaphase) la contraction des chromosomes à forme de balle la dégénération nucléaire des cellules, la pycnose des chromosomes et enfin l'apparition des chromosomes à pont. A tout cela il faut ajouter des altérations évolutives consistantes en mitoses polyploïdes ou pluripolaires avec la formation d'éléments parfois de

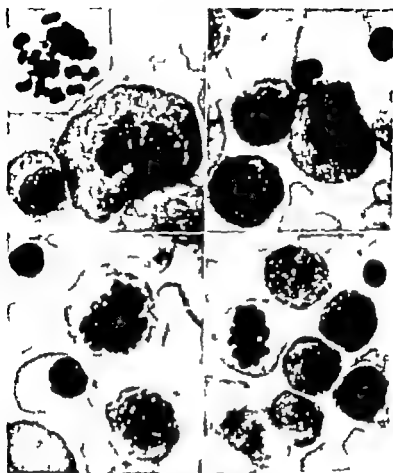


Fig 3 Contraction à forme de balle, condensation et pyknose des chromosomes.

dimensions gigantesques à deux ou plusieurs noyaux, fréquemment avec noyaux d'aspect différent des altérations des noyaux dans l'interphase l'homogénéisation, les condensation irrégulières, les lyses nucléaires ou pyknoses, les gemmations et encore des altérations cytoplasmiques telles que une irrégulière basophilie et une vacuolisation (fig 1 2 et 3)

La réaction PAS démontre que la plupart des éléments érythroblastiques (surtout dans les phases de maturation moins avancées) contient du matériel Schiff positif. Son aspect est variable et par conséquent il y a une coloration répandue du cytoplasme, des petites granulations à la périphérie, et très rarement des inclusions cytoplasmiques grossières.



Fig. 4. Inclusions de ferrocène avec configuration différentes, quelques fois groupées, dans le cytoplasme d'un érythroblaste

La réaction toujours presque négative dans les érythroblastes acidophiles, est négative dans les érythrocytes. Le traitement des frottis avec de la salive ne modifie pas le résultat de la réaction. La coloration par le noir de Sudan signale l'absence de matériel lipidique dans les éléments de la ligne érythroblastique.

Les études sur l'ultrastructure des éléments de la moelle osseuse, après fixation du matériel dans la solution de Palade et son inclusion en araldite, démontrent l'existence de nombreuses alté-



Fig. 5. Phénomènes de vacuolisation dans le cytoplasme d'un érythroblaste. La flèche montre une inclusion de ferritine entourée d'une double membrane.

tions, telles qu'un aspect hisuoïde des cellules proérythroblastiques, avec des mitochondries de nombre presque normal, qui sont dans la plupart des cas petits et presque ronds. On remarque de nombreuses inclusions de ferritine qui se présentent sous la forme d'amas ou bien de petits grains isolés. L'aspect du cytoplasme érythroblastique n'est pas régulier à cause de la présence d'extensions. Il y a des phénomènes de vacuolisation cytoplasmique, parfois très évidents (fig. 4-7).



Fig. 6. Erythroblaste à silhouette déchiquetée. Phénomènes de vacuolisation. A l'intérieur d'un acule il y a un amas de parcelles très denses (Béche)

Altérations érythrocytaires

L'un des axes de l'analyse de la myélose érythrémique aiguë est la destruction exagérée des érythrocytes, associée à une réduction parfois remarquable de la durée de vie des globules rouges. Ce phénomène n'a pas été entièrement illustré en ce qui concerne son essence, mais il est en général ramené aux anomalies des hématies érythriques. La remarque de WARR et coll. (30) sur la présence d'une hémoglobine anormale, proche de la Hb H par quelques propriétés, n'a pas été confirmée. Par contre nous n'avons pas trouvé d'études sur le taux d'enzymes et sur le caractère du métabolisme érythrocytaire dans la myélose érythrémique aiguë.

Notre cas de myélose érythrémique présente les signes d'une hyperhémolyse accentuée et un nombre de réticulocytes presque normal. Les résistances osmotiques et mécaniques des hématies sont inférieures à la norme. La durée de vie des érythrocytes marqués par le chrome radioactif (^{51}Cr) est réduite à 50%.

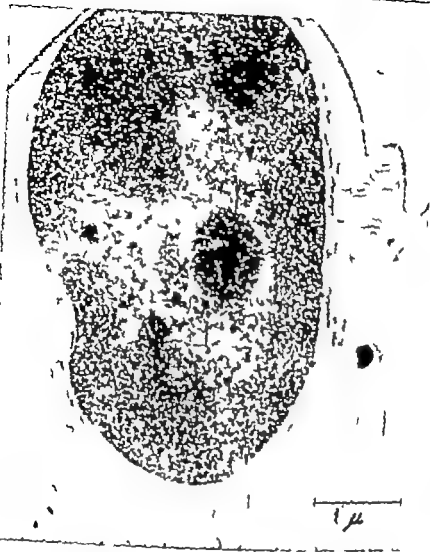


Fig. 7. Reticulocytes showing vacuolation of the cytoplasm in an erythroblast.

Les caractéristiques des hémoglobines à l'électrophorèse étaient normales. La consommation d'oxygène des hématies était légèrement inférieure à la norme. Par contre les valeurs de la glycolyse anaérobie étaient fort diminuées (tabl. I). Le tableau I montre que parmi les ferments de la voie glycolytique seulement l'aldolase est strictement anormale. L'activité de la glucose-6-déshydrogénase et de la transacétolase est normale tandis que l'activité de la 6-P-gluconate-déshydrogénase dépasse la norme. La concentration érythrocytaire de la glutathione réductase

est normale, celle de la déshydrogénase malique et de la transaminase glutamico-pyruvique n'est pas beaucoup inférieure à la norme, et les valeurs de la transaminase glutamico-oxaloacétique sont extrêmement réduites (à moins d'1/10 par rapport aux contrôles)

Le contrôle de l'activité glycolytique des érythrocytes avec de la glucose marquée par le ^{14}C a confirmé ces observations. La radioactivité érythrocytaire après incubation des cellules pendant 1 h avec la glucose $1\text{ }^{14}\text{C}$ et la glucose $\text{U }^{14}\text{C}$ respectivement a démontré toujours une réduction des valeurs d'incorporation de deux radionucléides (pour la méthode de détermination voir 23). Néanmoins l'exploitation du glucose $\text{U }^{14}\text{C}$ en aérobose est presque identique chez les sujets normaux et chez notre malade érythémique, tandis que celle du glucose- $1\text{ }^{14}\text{C}$ est plus évidente chez ce dernier (tabl. II)

Tableau I

Utilisation d'oxygène (en mm^3 de $\text{O}_2/\text{h}/10^8$ cellules), méthode de WARBURG (30); glycolyse anaérobie (en mm^3 de $\text{CO}_2/\text{h}/10^8$ cellules), méthode de WARBURG (30). Activités enzymatiques Aldolase (Ald) méthode de BERNE (6); glyceraldéhyde 3-P déshydrogénase (GA-3-PD) méthode de VELICK (29); pyruvate-kinase (PK) méthode de BOONER ET PYLIMMER (8); glucose-6-déshydrogénase (G-6-PD), méthode de KORNBERG ET HOROWITZ (21); 6-P-glucose-déshydrogénase (6-PGD) méthode de KORNBERG ET SEYMOUR (19); transketolase (TK), méthode de HOROWITZ ET BERNE (18); glutathione-réductase (GR) méthode de RACINE (17); malico-déshydrogénase (MDH) méthode de HISE ET GIBBY (17); transaminase glutamico-oxaloacétique (TGO) méthode de LAUDRY ET COLL. (20); transaminase glutamico-pyruvique (TGP), méthode de LAUDRY ET COLL. (20)

	O_2	Glycolyse	Ald	GA-3-PD	PK	G-6-PD
Erythémie aiguë	6,0	6,9	9,3	7,7	6,0	7,0
Valeurs normales	$7,1 \pm 1,4$	$11,8 \pm 1,7$	$16,8 \pm 2,9$	$7,0 \pm 1,9$	$3,4 \pm 1,6$	$7,1 \pm 1,9$
	6-PGD	TK	GR	MDH	TGO	TGP
Erythémie aiguë	7,8	13,2	9,0	9.200	16,1	1,02
Valeurs normales	$2,9 \pm 1,2$	$17,6 \pm 2,1$	$9,5 \pm 1,7$	12.960 ± 680	$143 \pm 8,9$	$122 \pm 9,6$

Les valeurs de l'activité aldolase sont données en U BERNE/ 10^8 cellules; les valeurs des activités malico-déshydrogénase, transaminase glutamico-oxaloacétique et transaminase glutamico-pyruvique sont données en U WARBURG/ 10^8 cellules; et les valeurs des autres activités enzymatiques sont données en unités arbitraires, dont 1 unité correspond à la quantité d'enzyme dans 1 ml d'échantillon capable d'entraîner une modification de l'absorption de 0,1 à 340 m μ , à 25°C en pendant une minute.

Les modifications de la glycose ne sont pas la seule expression d'une modification du métabolisme érythrocytaire dans l'érythrémie. Elles sont accompagnées d'altérations de la synthèse protéique et du métabolisme des aminoacides. Comme le tableau II montre, l'utilisation érythrocytaire de la glycine $1\text{-}^{14}\text{C}$ par les érythrocytes érythrémiqes est globalement réduite, et cette réduction est en relation avec une évidente diminution du taux de substances oxydés à $^{14}\text{CO}_2$. Au contraire la radioactivité des protéines et des polypeptides érythrocytaires est toujours augmentée dans les érythrocytes érythrémiqes en comparaison aux érythrocytes de sujets normaux. L'utilisation cellulaire de la cystine- ^{35}S est presque identique. La quantité globale utilisée est légèrement réduite et la quantité d'acides aminés incorporés dans les protéines et les polypeptides cellulaires est augmentée. La réduction globale de l'utilisation est de son côté attribuable à une baisse évidente de l'exploitation de la cystine avec dérivaison de soufre inorganique radioactive.

Tableau II

Valeurs absolues et valeurs en pour cent d'utilisation érythrocytaire de la glucose $1\text{-}^{14}\text{C}$, de la glucose $U\text{-}^{14}\text{C}$, de la glycine $1\text{-}^{14}\text{C}$ et de la cystine- ^{35}S , chez les sujets normaux et le malade d'érythrémie sigul, après incubation des cellules à 38°C , selon les modalités signalées de NOTARIO et coll. (15). Les valeurs sont données en c/mole/ 10^6 cellules.

Fraction aminoacides	Erythrémie sigul		Sujets normaux	
	Valeurs abs.	%	Valeurs abs.	%
Glucose $1\text{-}^{14}\text{C}$				
Radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$	249	61,5	141 ± 27	33,9
Radioactivité cellulaire	157	38,5	212 ± 31	60,1
Quantité globale utilisée des érythrocytes	406		353 ± 30	
Glucose $U\text{-}^{14}\text{C}$				
Radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$	80	20,0	82 ± 18	14,7
Radioactivité cellulaire	320	80,0	474 ± 52	83,3
Quantité globale utilisée des érythrocytes	400		556 ± 48	
Glycine $1\text{-}^{14}\text{C}$				
Radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$	203	18,5	421 ± 86	37,8
Radioactivité des protéines	530	50,2	489 ± 58	44,8
Radioactivité des polypeptides	342	31,3	210 ± 34	18,2
Quantité globale utilisée des érythrocytes	1075		1120 ± 63	
Cystine-^{35}S				
Radioactivité des protéines	1652	37,4	1067 ± 112	22,7
Radioactivité des polypeptides	214	4,8	115 ± 18	2,4
Radioactivité d soufre inorganique	2540	57,8	3518 ± 139	74,9
Quantité globale utilisée des érythrocytes	4406		4700 ± 116	

Discussion et Conclusions

Parmi les altérations érythroblastiques (morphologiques, évolutives et cytochimiques) que nous avons observées à propos d'un cas de myélose érythrémiqne aiguë nous avons attribué une signification particulière aux modifications de l'ultrastructure. Les phénomènes de vacuolisation cytoplasmatique avec des aspects érythroblastiques fréquemment «presque absurdes» sont une expression du trouble profond des cellules, qui sont destinées à l'avortissement local ou à la formation d'érythrocytes à vitalité réduite.

L'examen au microscope électronique démontre aussi d'inclusions de ferritine polymorphes chez un nombre élevé d'érythroblastes. Le phénomène est lié aux altérations du métabolisme du fer. En effet les valeurs de clearance plasmatique du ^{59}Fe sont augmentées, tandis que l'incorporation du fer radioactif dans les érythrocytes est très réduite (2, 28). De ces observations on peut conclure, que la production d'hémoglobine, évaluée selon le turnover plasmatique du fer est très élevée. Elle est de même réduite d'une façon remarquable si l'on considère la quantité de fer utilisé par les érythrocytes. Ce phénomène est le signe d'une érythropoïèse inefficace.

Les résultats obtenus à propos de la constitution enzymatique et du métabolisme des érythrocytes nous permettent de mieux établir le second élément pathogénétique de l'anémie dans la myélose érythrémiqne aiguë, la destruction anormale des érythrocytes. L'hyperhémolyse est attribuable à une altération intracellulaire. Nos résultats montrent une chute de la glycolyse anaérobie, avec une réduction de la concentration de l'activité aldolase sans modification des autres activités enzymatiques de la glycolyse anaérobie. Vu l'importance de ce défaut enzymatique, il faut se souvenir que parmi les enzymes des érythrocytes, normalement réduits en comparaison à ceux des cellules nucléées, l'activité aldolase est au niveau le plus bas (7). On comprend par conséquent comme cette réduction, bien que légère, soit capable de ralentir d'une façon évidente les processus glycolytiques (24). De même on doit considérer que l'exploitation anaérobie de la glucose est la plus importante source énergétique de l'érythrocyte (4) indispensable à la conservation de l'équilibre ionique.

Nous devons souligner aussi la chute très marquée de l'activité de la transaminase glutamico-oxaloacétique, bien que les valeurs

de l'activité glutamico-pyruvique soient presque normales. Nous ne pouvons pas interpréter ce phénomène, néanmoins nous désirons souligner que déjà INTROZZI et coll. (22) ont observé un procédé analogue chez les leucocytes leucémiques.

Les modifications de la glycolyse des érythrocytes chez notre malade érythrémique sont confirmées par le contrôle du procédé de la glycolyse, effectué à l'aide de la glucose marquée par le ^{14}C en position 1. L'exploitation de la glucose- U^{14}C en aérobose est presque identique chez les érythrocytes normaux et érythremiques tandis que celle de la glucose 1^{14}C est plus évidente chez les derniers. Nous avons interprété ce phénomène comme une preuve d'une majeure activité de la voie glycolytique de EMMER MEYERHOF chez les érythrocytes érythremiques et comme confirmation indirecte d'une activité réduite de la voie glycolytique normale avec exaltation de la voie oxydative directe pour alternative métabolique.

Bien que les altérations les plus évidentes se trouvent au niveau de la glycolyse anaérobie, nous avons observé aussi des modifications du métabolisme protéique. Ces sont les modifications de l'utilisation de la glycine et de la cytosine, avec réduction de l'utilisation globale des deux substances et augmentation relative de leur incorporation dans les protéines et les polypeptides. Nous avons interprété ces modifications comme l'expression d'une réduction des processus oxydatifs cellulaires dans l'érythémie avec augmentation modérée de la synthèse protéique, d'une façon analogue à ce que nous avons observé chez les leucocytes leucémiques (23). Ces variations métaboliques, en conclusion, témoignent un trouble évident du métabolisme cellulaire dont il est aujourd'hui presque impossible de suivre tous les aspects. Des recherches plus poussées permettront de mieux éclaircir la signification de ces altérations, qui sont parmi les plus intéressantes dans cette maladie.

Résumé

Chez un cas d'érythémie aiguë des altérations évidentes des images microscopiques ont été observées. L'examen au microscope électronique a permis de révéler des inclusions de ferritine dans les cytoplasmes des érythroblastes et une accumulation très évidente. Les érythrocytes montrent des anomalies métaboliques et enzymatiques remarquables: une réduction de la glycolyse anaérobie; une diminution de l'incorporation de la glucose 1^{14}C et de la glucose U^{14}C ainsi que d'une utilisation de la glycine 1^{14}C et de la cytosine- ^{14}S , et une chute des activités de l'aldolase et de la transaminase glutamico-oxalacétique.

Summary

Marked meiotic changes were found in a patient with acute erythroblastic myelosis. Microscopic examination showed ferritin inclusions and extensive vacuolization of the erythroblasts. The erythrocytes showed remarkable enzymatic anomalies: reduction of anaerobic glycolysis, reduced glucose-1-¹⁴C and glucose-1-¹⁴C and utilization of glycine-1-¹⁴C and decreased aldolase and glutamate-oxaloacetate transaminase activity.

Zusammenfassung

Bei einem Patienten mit akuter erythroblastischer Myelose fanden sich Veränderungen der Mitosebilder. Elektronenmikroskopisch wurden im Zytoplasma der Erythroblasten Einschlüsse von Ferritin und eine starke Vakuolisierung nachgewiesen. Die Erythrozyten zeigten Anomalien des Stoffwechsels und der Enzyme: eine Verringerung der anaeroben Glykolyse, eine Herabsetzung des Einbaus von Glukose-1-¹⁴C und von Glukose-1-¹⁴C, sowie der Verwertung von Glycin-1-¹⁴C und Cytin-¹⁴C und ein Abfall der Aktivitäten der Aldolase und der Glutamat-Oxaloessigsäure Transaminase.

Bibliographie

1. ASTALDI, G. AND TOLIVINO, P. Studies in vitro on maturation of erythroblasts in normal and pathological conditions. *J. clin. Path.* 2 217 (1949).
2. BALDRI, M.; FUCINERARIO, H.; F. TUTTA, K. AND DAVANIER, W. The anemia of De Goffelino syndrome. *Blood* 14 334 (1959).
3. BERNARDINI, E., MIELI, V. AND BANG, M. Experimental research on the proliferative activity of the erythroblasts in chronic erythremia, the chronic form of De Goffelino disease. *Blood* 9 609 (1956).
4. BLOOMFIELD, R. E. Rates of glycolysis in human red cells in relation to energy requirements for cation transport. *Nature* 172 911 (1953).
5. BROSS, M. ET THIRY, J. P. Etude au microscope électronique des hémosarcomes humains. III. Leucémies à cellules-ouches, érythèmes, réticulo-lymphomatoses, leucémie de Hodgkin, plasmocytomes. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* 2 577 (1962).
6. BUCHS, F. Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase. *Biochem. Z.* 325 156 (1954).
7. BUCHS, F. Über die Aldolase der Erythrozyten. *Biochem. Z.* 325 429 (1954).
8. BOCHER, T. AND FLEISCHER, G. Pyruvate Kinase from Muscle in Cabot's and Kaplan Method in Enzymology vol. 1 p. 323, Academic Press, New York (1955).
9. BONE, L., PIZZI, F., CARRARA, P. M., TAGLIARINI, D. Contributo sperimentale alla conoscenza del megalo-blasto eritremico. *Haematologica* lat. 2 229 (1960).
10. DI GUOLIELMO, G. Ricerche di ematologia I. U. caso di eritroleucemia. *Folia med.* 11 386 (1917).
11. DI GUOLIELMO, G. Eritremia acuta. *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia* 40 663 (1926).
12. DI GUOLIELMO, G. Le malattie eritremiche ed eritroleucemiche. Pensiero Scientifico Ed., Roma (1960).
13. GARDNER, G., NORDEN, A. AND S. ALLEN, G. G. Cytochemical investigations and serum vitamin B₁₂ determinations in a case of erythroleukemia. *Acta Med. Scand.* 171 243 (1962).
14. G. ONTO, F., MARATTA, G. AND A. A. R. Radioautographic investigations on DNA and protein metabolism in 2 cases of De Goffelino disease. *Blood* 16 1122 (1960).
15. GROSS, J. I., FOLLOCK, A. AND S. ANKEL, I. De Goffelino syndrome with low serum vitamin B₁₂. *Postgrad. med. J.* 37 31 (1961).

de l'activité glutamico-pyruvique soient presque normales. Nous ne pouvons pas interpréter ce phénomène, néanmoins nous désirons souligner que déjà Introzzi et coll. (22) ont observé un procédé analogue chez les leucocytes leucémiques.

Les modifications de la glycolyse des érythrocytes chez notre malade érythrémique sont confirmées par le contrôle du procédé de la glycolyse, effectué à l'aide de la glucose marquée par le ^{14}C en position 1. L'exploitation de la glucose U ^{14}C en aérobiose est presque identique chez les érythrocytes normaux et érythrémi-ques tandis que celle de la glucose I ^{14}C est plus évidente chez les derniers. Nous avons interprété ce phénomène comme une preuve d'une majeure activité de la voie glycolytique de EMBURY-MEYERHOF chez les érythrocytes érythrémi-ques et comme confirmation indirecte d'une activité réduite de la voie glycolytique normale avec exaltation de la voie oxydative directe pour alternative métabolique.

Bien que les altérations les plus évidentes se trouvent au niveau de la glycolyse anaérobie, nous avons observé aussi des modifications du métabolisme protéique. Ces sont les modifications de l'utilisation de la glycine et de la cytosine, avec réduction de l'utilisation globale des deux substances et augmentation relative de leur incorporation dans les protéines et les polypeptides. Nous avons interprété ces modifications comme l'expression d'une réduction des processus oxydants cellulaires dans l'érythrémie avec augmentation modérée de la synthèse protéique d'une façon analogue à ce que nous avons observé chez les leucocytes leucémiques (23). Ces variations métaboliques, en conclusion, témoignent un trouble évident du métabolisme cellulaire, dont il est aujourd'hui presque impossible de suivre tous les aspects. Des recherches plus poussées permettront de mieux éclaircir la signification de ces altérations, qui sont parmi les plus intéressantes dans cette maladie.

Résumé

Chez un cas d'érythrémie aiguë des altérations évidentes des images morphologiques ont été observées. L'examen au microscope électronique a permis de révéler des inclusions de ferritine dans les cytoplasmes des érythroblastes et une accumulation très évidente. Les érythrocytes montrent des anomalies métaboliques et enzymatiques remarquables: une réduction de la glycolyse anaérobie; une diminution de l'incorporation de la glucose I ^{14}C et de la glucose-U ^{14}C ainsi que de l'utilisation de la glycine- ^{14}C et de la cytosine- ^{14}C et une chute des activités de l'aldolase et de la transaminase glutamino-malacétique.

The Thalassaemia Syndromes

1. Cooley's Anaemia with Low Level of Fetal Haemoglobin. A Genetic
in Four Families

By M. AKSOY AND S. ERDEM

Istanbul Medical School, Cape Internal Clinic, Vahaf Guraba Hospital, Istanbul

Fetal haemoglobin detected by alkali denaturation (1) was found in large quantities in COOLEY'S anaemia. All investigators agree that the level of fetal haemoglobin varies considerably, namely between 10 and 90% (2,3). According to SILVESTRONI AND BIANCO (4) and BEAVEN *et al.* (5) the average levels of alkali resistant haemoglobin were high, 41 and 50% respectively. As it is generally accepted, there is no correlation between the amount of fetal haemoglobin and the haematologic severity of thalassaemia major (6, 7). Furthermore SMITH *et al.* (8) have rightly indicated that there is no clear relationship between the level of alkali resistant haemoglobin and the presence or absence of the spleen (8).

Although in COOLEY'S anaemia fetal haemoglobin is present in large quantities, in some cases reported by several investigators the quantity of alkali resistant haemoglobin was comparatively low varying between 10.8 and 20% (2, 9).

During the recent years we performed haemoglobin analysis of 48 patients with thalassaemia major. Although the level of fetal haemoglobin was high in 44 of them, varying between 12.5 and 95%, it was exceptionally low (2.5, 3.2 and 7.6%) in four cases of COOLEY'S anaemia.

The purpose of this paper is to report four patients with thalassaemia major exhibiting very low levels of fetal haemoglobin.

Very low levels of fetal haemoglobin, such as 1.6, 3.3, 3.8, 4.7 and 6.1%, have been found in some cases of Mediterranean anaemia reported from Thailand by MURPHY *et al.* (10). But later re-investigation of these patients by paper electrophoresis showed that some of them were examples of thalassaemia-haemoglobin E disease (11). Therefore, we were not inclined to include these cases with low fetal haemoglobin in this group.

below 10° and to discuss several genetic concepts which might explain the basic defect of thalassaemic syndromes.

Methods

The haematological methods were all standard techniques. Haemoglobin determinations were made on Klett-Summerson photoelectric colorimeter. Fetal haemoglobin was determined by the method of SINGER *et al* (1). Haemoglobin A₂ as determined by the method of discontinuous TRIS buffer paper electrophoresis, by starch block electrophoresis and also by starch gel electrophoresis (12-16). The maximum normal values for haemoglobin A₂ in these methods were 3.5 in the first two and 4 in the last one.

Case Reports

Case 1 A 9 year-old Turkish girl from Istanbul was referred to our laboratory for haemoglobin analysis. She has been noted to be anaemic since early childhood. She was hospitalized often in pediatric clinics in Istanbul because of anaemia and lassitude and was diagnosed as having Cooley's anaemia. Physical examination revealed an anaemic looking girl with normal stature. Her sclerae were subicteric. The spleen was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated a

Table 1

Haematologic data on four patients with Cooley's anaemia exhibiting low levels of fetal haemoglobin.

Haematologic Data	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
RBC (10 ⁶ cu. mm.)	3.70	2.00	3.80	2.01
Hb (g)	8.2	4.5	8.8	4.6
WBC cu. mm.	16,000	8,000	16,300	13,501
Retardocytes ()	4	3.5	4	14
Haematocrit ()	24	16	29	16
MCV (cu. μ)	63	80	77.4	80
MCHb (μ g)	—	22.5	21	22
MCHC 100 WBC	1	2	5	3
Anisocytosis	+++	++	++	++
Polychromatophilus	—	—	—	—
Poikilocytosis	++	++	—	—
Microcytosis	+++	+	—	—
Hypochromia	+++	++	—	—
Target-cells	—	—	—	—
Total bilirubin (mg. %)	1.8	1.8	1	3.7
Osmotic fragility % NaCl	4-18	18-26	4-26	4-16
Serum iron (μ g ¹⁰⁰)	87	140	85	—
Direct Coombs test	—	—	—	—
Fetal haemoglobin	7.6	3.2	5	—
Haemoglobin A ₂	3 ^a	1.4	0 ^a	—
G-6P-D screening test	Normal	—	—	—

^aNot determined

Performed by Dr. H. LANGE in 1955.

Performed by starch block electrophoresis 114

Performed by discontinuous TRIS buffer paper electrophoresis 12, 13

Performed by starch gel electrophoresis 13, 16

Table II

Haematologic data on the family members of four cases of COOLEY anaemia exhibiting low levels of fetal haemoglobin.

	Hb (g%)	Hct (%)	Hct/crit	Hb/crit	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Observed/Calculated Fetal Hb (%)	Transfusions	Age	Sex
Family 1										
Mother	5.40	10.8	41	74	20	1.5		+	3	
Father	5.20	12	48	92	23	1	46-26	+	0	
Sister	5.00	11	40	80	22	1		+	0	6
Family 2										
Mother	4.90	10	40	83	23	1.5	44-28	++ ~ +	3.5	2 ^a
Father	5.90	13	45	84	24	1	46-28	++	0	7 ^a
Family 3										
Mother	4.65	12.1	41	88	26	1	48-3	+	0	7 ^a
Father	5.40	14.4	50	92	26.6	0.5	44-36	-	0	4 ^a
Family 4										
Mother	4.60	10.8	37	80	23.5	2	46-26	+	0	
Father	5.10	13.7	45	88	27	1	44-26	+	III	

^a Not determined.

Performed by starch block electrophoresis (14)

Performed by starch gel electrophoresis (15, 16)

striking thickening of the diaphysis with mild trabecular striation and marked osteoporosis with "honey-combed" appearance around the elbow joint. The laboratory data are summarized in Table I.

Family study: Both parents were Turkish immigrants from Bulgaria. The mother, 39 year old woman, had stigmata of thalassemia minima, including increased haemoglobin A₂. Her father, 41 year old man, had stigmata of thalassemia minima including increased haemoglobin A₂. A healthy sister, 14 year-old girl, had mild stigmata of thalassemia minima including increased haemoglobin A₂. Their haematologic data are summarized in Table II.

Case 2: A 2.5/12 year-old Turkish boy from Thrace was referred to our laboratory for haemoglobin analysis. The boy was almost normal until 6 months when anaemia, lassitude and mild jaundice appeared. He was hospitalized several times in pediatric clinics in Istanbul and was diagnosed as having COOLEY anaemia. He was transfused several times when anaemia was very severe. The last transfusion was performed nearly 3 months ago. Physical examination revealed a very pale looking boy with sclerotic sclerae. He had mongoloid facies and frontal bossing. The spleen was enlarged three fingerbreadths and the liver one fingerbreadth below the costal margin. His haematologic data are summarized in Table I. X-ray of the skeleton revealed moderate osteoporosis around the elbow joint.

Family study: His parents were in good health. The mother, 29 year old woman, had mild stigmata of thalassemia minima including slightly elevated haemoglobin F. The father, 38 year-old man, had mild stigmata of thalassemia minima including increased haemoglobin A₂. One sister died at the age of four of anaemia similar to her brother's illness. Their haematologic data are summarized in Table II.

Case 3. A one year-old Turkish boy from Istanbul was referred to the outpatient department of the 2nd Internal Clinic of Istanbul Medical School for haemoglobin analysis. He was anaemic and icteric for three months. Physical examination revealed a very pale and mildly subicteric boy. The spleen was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated moderate thickening of diploic space on frontal area and osteoporosis of the elbow joints and of the bones of the hands. The splenic puncture revealed a moderate extramedullary erythropoiesis with 65% of nucleated red cells. The laboratory data are recorded in Table I.

Family study. Both parents were alive and both were in good health. They are not relatives. The mother, a 29 year-old woman, had mild stigmata of thalassaemia minima including increased haemoglobin A_2 . The father, 36 year old man, had no findings of thalassaemia minima including normal levels of haemoglobin A_1 and F. Their haematologic findings are summarized in Table II.

Case 4. A one year-old Turkish boy from Mardin was brought to the outpatient department of Mardin State hospital because of anaemia, jaundice and lassitude in 1955. He has been noted to be anaemic and icteric for six months. Now and then, he had irregular fever and diarrhoea of short duration. Physical examination revealed a very pale and subicteric boy. The spleen extended to the crest and the liver was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated a moderate osteoporosis around the elbow joints. The laboratory data are summarized in Table I. The splenic puncture disclosed mild extramedullary erythropoiesis with 3% orthochromasate normoblasts.

Family study. His parents were relatives. Both had the mild stigmata of thalassaemia minima. Their haematologic data are recorded in Table II.

Discussion

As will be seen from the case reports and tables, our four patients represent the severe or moderately severe form of thalassaemia major. They exhibit all clinical and haematologic stigmata characteristic of this congenital haemolytic anaemia, such as marked hepatosplenomegaly, the morphologic abnormalities, the corpuscular constants, the increased osmotic resistance of the erythrocytes, signs of increased haemolysis and hypochromic microcytic anaemia. Genetic patterns of these patients are constant with that of COOLEY's anaemia. The results of haemoglobin analysis obtained from the families 1 and 2 indicate that the cases 1 and 2 are beta-thalassaemic homozygotes. In both parents of cases 1 and 2 increased amounts of either haemoglobin A_2 or haemoglobin F have been found. Therefore cases 1 and 2 are beta thalassaemic homozygotes. On the other hand, the results of the family study of case 3 show that the mother is asymptomatic beta thalassaemic heterozygote (increased haemoglobin A_2). The father, on the contrary, is apparently normal and exhibits no haematologic findings that would indicate the presence of a thalassaemia gene (haemoglobins A_2 and F are within normal limits). The father may possibly be considered an asymptomatic carrier of a gene responsible for

alpha-thalassaemia. As the family study of case 2 was in 1955, haemoglobin A_2 determinations were not possible. Therefore, it is impossible for us to decide whether an alpha and beta thalassaemic heterozygote or a beta homozygote. According to the genetic concept of STRATTON (17) a homozygotic state for alpha thalassaemia is compatible with life after delivery. On the contrary Q (18) recently reported a case of homozygous alpha thalassaemia with normal level of fetal haemoglobin at the age of 3 years. Therefore, the possibility of homozygosity for alpha thalassaemia also be considered in case 4.

The results of haemoglobin analysis relating to the four patients with COOLEY's anaemia were of great interest, as the levels of fetal haemoglobin were less than 10% (2, 5, 5.2 and 7.6%). This results

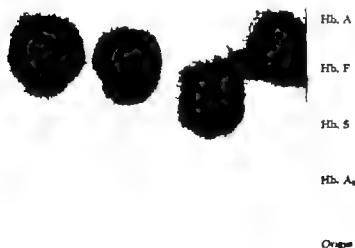


Fig. 1. Starch gel electrophoresis at borate buffer 0.025 M, pH 8.6. From left to right: A + F + increased A_2 (thalassaemia major with low level of fetal haemoglobin: Hb. F 7.6% and Hb. A_2 5.1%); A + F + increased A_2 (COOLEY's anaemia: Hb. F 5.2% and Hb. A_2 4.6%); S + F + A_2 (sickle cell-anaemia: Hb. S 78%, Hb. F 19% and Hb. A_2 2.1%); Hb. A + Hb. A_2 (normal). The gel was photographed after staining with Buffalo-Black in methanol.

22. MARKS, P. A., GERALD, P. AND CHRISTY, N. The thalassemia syndromes. Biochemical, genetic and clinical considerations. *Amer J Med.* 35: 919 (1964)
23. VAYRA, J. D.; MAYER, V. K. AND MOORE, C. V. In vitro heme synthesis by human blood; abnormal heme synthesis in thalassemia major. *J Lab. clin. Med.* 63: 736 (1964).
24. INGRAM, V. M. The Hemoglobins in Genetics and Evolution, p. 113 (Columbia Univ Press, New York 1963)
25. BURKE, E. AND MARKS, P. A. Ribosomes active in protein synthesis in human reticulocytes. A defect in thalassemia major. *Nature* 199: 706 (1963)
26. VAYRA, J. D. AND MAYER, V. K. *In vitro* porphyrin synthesis by human blood; porphyrin synthesis by thalassemic erythrocytes. *J Lab. clin. Med.* 63: 754 (1964).

Authors' address: Drs. M. Aksoy and S. Erdem, Istanbul Med. School, Çapa Internal Clinic, V. skif Osmanlı Harp., Istanbul (Turkey).

Department of Oncology Hadassah University Hospital, Jerusalem

The Effect of Typhoid Vaccine Injection of Partial Body Irradiated Rats

By E. ROBINSON AND A. HOCHMAN

It is well known that partial body irradiation produces leukopenia. It is not clear whether this is only due to a direct effect on the irradiated area or also to an indirect effect by a factor having an influence beyond the treated area (1-2). Typhoid vaccine injection has biphasic influence on the white blood cells. In the first hour there is a fall in the leucocyte count due to the sequestration of cells in the reticulo-endothelial tissues and later there is an increase in the circulating leucocytes due to liberation of cells from the bone marrow (4).

In order to further elucidate the leukopenia of partial body irradiation, we have examined irradiated rats after injection of typhoid vaccine.

Material and Methods

Male rats (Hebrew University local strain) weighing 200-250 grams were fed ad libitum on water and food pellets. Partial body exposures were given at dose rate of 130 rad/hour at 200 KV (using filters of 0.5 mmCu and 1.0 mmAl.). Animals exposed to localized irradiation were anesthetized with 30 mg/kg intraperitoneal sodium pentobarbital. Total leucocyte counts were performed immediately before and on the 3rd day after irradiation. On the 3rd day one ml. typhoid vaccine (1000 millions *S. typhi*, 500 millions *S. para typhi A* and 500 millions *S. para typhi B*.) was injected subcutaneously and leucocyte counts performed after 1, 4 and 6 hours.

4 groups of rats received upper-body irradiation (from the xyphoid upwards) and 4 groups lower-body irradiation (caudally to the xyphoid). Each group contained 12 to 15 rats. The doses given to the respective groups were 250r, 500r, 750r and 1000r. A control group of animals received typhoid vaccine but were not irradiated.

Results

The results are recorded in Fig. 1 and 2 and Table I. The non-irradiated control group showed a fall in the leucocyte count in the first hour after the injection of 1 ml of typhoid vaccine and then a gradual increase to above the pretreatment value.

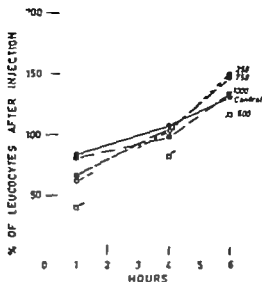


Fig. 1 Effect of typhoid vaccine injection in upper body irradiated rats.

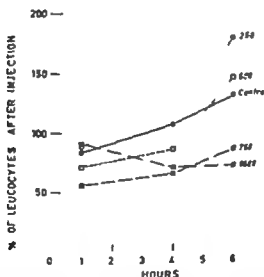


Fig. 2 Effect of typhoid vaccine injection in lower body irradiated rats.

In the upper-body irradiated groups, which received 250r, 500r and 750r the one hour leucocyte counts were lower than in the control group. The 6-hour rise in the cell count in these groups was not significantly different from that in the control animals. In the 1000r irradiated group the 1, 4 and 6-hour counts were not

Table I
Leucocyte counts in irradiated and typhoid vaccine injected rats

Area of irradiation	Lower body 250r	Upper body 250r	Lower body 500r	Upper body 800r	Lower body 750r	Upper body 750r	Lower body 1000r	Upper body 1000r	Control not irradiated
Pre-irradiation	100	100	100	100	100	100	100	100	
5 days after irradiation	63	63	43	78	46	63	44	32	100
1 h after typhoid vaccine injection	80	62	71	40*	56	66	91	82	81
4 h after typhoid vaccine injection	119	103	86	81	66	106	71	98	107
6 h after typhoid vaccine injection	179	149	146	116	88	148	72	133	131

percentage of 5th day count.

significantly different from the control. In the lower body irradiated group which received 250r the one hour count did not differ from the control, but the 6 hour increase was higher than in the control. In the 500r and 750r lower body irradiated groups there was a larger initial fall in the leucocyte count. In the 750r group there was a smaller subsequent rise in the number of the cells compared with the control. In the 1000r group the one hour count was similar to that in the control animals but the 6 hour count showed that the release of cells from the bone marrow was significantly depressed.

Discussion

In a previous communication we found that the antiglobulin consumption test becomes positive after partial body irradiation, although less strongly than after chemotherapy indicating that partial body irradiation damages the leucocytes (3). The present experiments show that the one hour leucocyte count was lower in the upper body than in the lower body irradiated groups. The 4 and 6 hour counts show that the release of leucocytes from the bone marrow was more depressed in the lower body than in upper body irradiated groups. The probable explanation of this is that irradiation damages both the intravascular leucocytes and the cells in the bone marrow. Typhoid vaccine injection augments the sequestration of damaged cells in the reticulo-endothelial system in the first hour. As the blood volume is larger in the upper than in the lower-body a lower one hour white cell count is seen in the upper body irradiated group. The active bone marrow is mostly concentrated in the lower body and so the 4 and 6 hour counts,

which represent the release of cells from the bone marrow are lower in the lower body than in the upper body irradiated group. The 1 hour count in the groups which received 1000r was similar to that in the controls. This was probably due to the fact that this dose destroyed most of the cells so that the typhoid vaccine could not augment the sequestration of intravascular cells.

It is of interest that the 6 hour leucocyte count in the 250r lower body irradiated group was higher than the control. It is possible that this dose stimulates the bone marrow to release more cells.

Acknowledgments. We are grateful to Miss B. Davidson for technical assistance, and to Dr. Ginzert for the supply of the typhoid vaccine.

Summary

Typhoid vaccine was injected into partial body irradiated rats in an attempt to elucidate the mechanism of irradiation induced leukopenia. Upper body irradiation predominantly damages intravascular leucocytes. Lower body irradiation depresses the release of leucocytes from the bone marrow and also damages intravascular leucocytes, but to a lesser degree than upper-body irradiation.

Zusammenfassung

Um den Mechanismus der Bestrahlungsleukopenie aufzuklären, wurden Ratten nach partieller Körperbestrahlung Typhus-Vaccine injiziert. Bestrahlung der oberen Körperhälfte schädigt vor allem die intravasculären Leukozyten. Bestrahlung der unteren Körperhälfte vermindert die Abgabe von Leukozyten aus dem Knochenmark. Sie schädigt auch die intravasculären Leukozyten, jedoch in geringerem Grade als die Bestrahlung der oberen Körperhälfte.

Résumé

Dans le but d'élucider le mécanisme de la leucopénie par irradiation, nous avons injecté à des rats des vaccins anti-typhiques après irradiation partielle de l'organisme. L'irradiation de la partie supérieure de l'organisme endommage surtout les leucocytes intravasculaires. L'irradiation de la partie inférieure de l'organisme diminue la libération des leucocytes de la moelle osseuse et endommage aussi les leucocytes intravasculaires, cependant à un degré moindre que ne le fait l'irradiation de la partie supérieure de l'organisme.

References

1. ECKHART, A. New evidence for a toxic substance elaborated after irradiation. *Frd. Proc.* 14: 42 (1935).
2. OROSCO, E. E. Is the action of roentgen rays direct or indirect? *Amer. J. Roentgenol.* 49: 14 (1942).
3. ROBINSON, E. AND NELSON, D. The direct antiplatelet consumption and after radiotherapy and chemotherapy. *Acta haemat.* 30: 138-143 (1963).
4. TORREY, J. H., MAKER, G. S., YATES, A. K., DAVIS, C. J. F., GARTNER, D. A. AND WARDING, I. S. The discharge of granulocytes from guinea pig marrow in response to intravenous T. A.B. vaccine: A quantitative study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 113: 790-799 (1964).

Authors' address: Drs. E. Robinson and A. Hochman, Dept. of Oncology Hadassah Univ. Hospital, Jerusalem, Israel.

Department of Medicine (Dir. Prof. J. VANDERBRUGGE) The Laboratory of Blood
Coagulation and Fibrinolysis (Dir. Prof. M. VERSTRAETE) University of Louvain

A Technique for Routine Evaluation of Plasminogen in Humans during Streptokinase Therapy

By R. A. DE VREEKER

The blood level of plasminogen can adequately be used as a guiding parameter for streptokinase (SK) dosage in intravascular clot dissolution. This results from studies on artificially induced venous clots (10) as well as on spontaneous arterial occlusions (12). These studies stressed that the achievement of a marked fall in circulating plasminogen, below 10% of normal, is a prerequisite for attaining safe therapeutic conditions and the maintenance of this low level is associated with a high incidence of therapeutic success. Whether excessive plasminogen depletion, below 2% of normal, ought to be avoided is still debated. Plasminogen depletion is favourable for safe haemostasis, as plasmin formation and subsequent proteolysis of coagulation proteins is greatly decreased. If then, however rethrombosis occurred, the plasminogen-deficient thrombus would be resistant to SK. This drawback of depleting the blood plasminogen excessively during SK treatment has been demonstrated for artificial occlusions formed in damaged blood vessels (10). Thus, an assay method with sensitivity range below 10% of the normal human plasminogen level is to be used for dosage evaluation in SK therapy.

During the *in vitro* reaction between SK and human plasminogen in diluted plasma two entities can form. Optimal formation of plasmin (E.C.3.4.4.14) occurs at low SK to human plasminogen ratios. At very high SK to plasminogen ratios essentially activator is formed: this is an entity capable of converting human or other plasminogen into plasmin. Plasmin can be assayed directly by proteolysis or esterolysis measurements after optimum conversion

of the proenzyme into plasmin. However these methods lack the desired sensitivity as will be reported below. Moreover the test sample has to be incorporated in the test system at a high concentration, where plasma inhibitors interfere. Preference is given to methods using maximal SK induced conversion of the human plasminogen into activator subsequently converting into plasmin bovine plasminogen, insensitive to SK. In standardized conditions, the rate of proteolysis of a sensitive substrate by the bovine plasmin, formed in the presence of an excess of both SK and bovine plasminogen, is a measure of the activator and, therefore, of the human plasminogen present in the test system. It is appropriate to the studied therapeutic condition to define a human plasminogen in terms of its ability to form SK induced activator as activator in the blood is important in intravascular clot lysis (13).

Bovine fraction I preparations constitute, after *in situ* conversion into fibrin, an accessible substrate and provide in addition the needed bovine plasminogen. With serial dilutions of the test sample, as the only variable, the times for reaching endpoints of clot lysis are inversely proportional to enzyme activity. From this time vs. dilutions relation, linearized on a double logarithmic graph, the amount of test substance causing a lysis endpoint in 30 minutes is interpolated. A similar method was briefly introduced by CHRISTENSEN (5) and improved by JOHNSON AND TILLEY (11). Lysis is recorded in terms of viscosity decrease, the endpoint being taken when airbubbles trapped in the fibrin clot spontaneously move into the meniscus. The performance details of a plasminogen assay method meeting the above requirements of sensitivity and standardization will be described.

Materials

Buffer solutions. All pH measurements were performed with Radiometer equipment and combined long-term electrode type GK 2201 B. The adjustment buffer was Sevenm phosphate solution standardized at 20°C against 0.05 M potassium acid phthalate of pH 4.00. Unless otherwise stated, all solutions and test systems were made up in borate buffer of pH 7 and ionic strength (I) of nearly 0.1, prepared by dissolving in 700 ml distilled water 11.1 g boric acid (H_3BO_3), 8.3 g sodium tetraborate ($Na_2B_4O_7$), 10 H_2O and 9.0 g sodium chloride, adjusting the pH by addition of concentrated HCl and diluting to a volume of 1000 ml. Buffer solutions of different ionic strength were prepared by varying the NaCl concentration only.

Streptokinase. Asialokinas (R) (Kabi AB, Stockholm) and 'Streptokinase' (Merk, Sharp, and Dohme Research Laboratories, West Point) were used to make up streptokinase solutions whose concentrations are expressed in streptokinase units in comparison with a reference, standardized against the 'NHI streptokinase reference preparation

testative' The 10-15% excess, which usually was titrated in 'habukinase (R)' batches over the value mentioned on the label, was not taken into account. When 'Streptokinase' (Merck, Sharp, and Dohme Research Laboratories) was used, the value appearing on the label was multiplied by 2/3 to be compared with the NIH standard. All solutions were kept in plastic tubes on ice or if not used within 4 h, stored at -20°C .

Bovine fibrinogen. Lyophilized bovine fibrinogen preparations of three different commercial sources were mainly used. Bovine fibrinogen lyophilized powder batch 57 (Foviet Produktion, Amsterdam) is referred to as Fibrinogen Foviet. Bovine fibrinogen Fraction I from bovine plasma, batch HB 227 (Armour Pharmaceutical Company Ltd., Eastbourne) is referred to as Fibrinogen Armour. Finally bovine fibrinogen batch 703 B (Behringwerke AG, Marburg) is referred to as Fibrinogen Behring.

The material necessary (see below) for 10 ml solution was weighed out, dissolved in 2 ml buffer at 37°C with occasional shaking, diluted, and kept at room temperature. Under these conditions, solutions of both Fibrinogen Foviet and Behring remain stable for use over one day. The stability of Fibrinogen Armour extends only over 4 h but may adequately be prolonged if the solution is kept at 0°C . Fibrinogen Foviet solutions, however, if kept in the cold, rapidly change their properties owing to cryoprecipitate formation. Fibrinogen Armour is by far most easy to dissolve. The coagulability of these solutions on both protein and a dry weight basis has been determined on several occasions by the urea method of Bloomfield and Bloomfield (4). The coagulability varied 77% for Fibrinogen Foviet, 85% for Fibrinogen Armour and 94% for Fibrinogen Behring. The recovery of clottable fibrinogen in solution, with respect to the dry powder averaged 52% in the case of Fibrinogen Foviet, 46% for Fibrinogen Armour and 73% for Fibrinogen Behring.

In some instances bovine fractions I-4 (4), 96-98% coagulable, and I-4 E (2), 85% coagulable and plasminogen-free, were used after thawing and diluting with an appropriate buffer-NaCl mixture to desired protein concentration.

Fibrinogen concentrations in the text refer to the amount of lyophilized material (commercial) or total protein (home-made) introduced in the system, not taking into account clottability or recovery figures.

Thrombin (E.C. 3.4.4.15) Mainly lyophilized bovine thrombin, containing around 130 NIH units per mg, was used. Two commercial preparations, Topostasin (R) (F Hoffmann-La Roche, Basel) and Thrombin Topical (Parke, Davis & Co., Detroit) though less potent, were found as effective as the homemade preparation. The material was dissolved to proper strength and kept in plastic tubes on ice or stored at -20°C . For routine work, it was found more convenient to dissolve the material in 80 NIH units/ml concentration in 50% (vol/vol) glycerol in 0.1 M sodium acetate pH 5.5. This stock solution remained stable for months at $+2^{\circ}\text{C}$ and was diluted prior to use with 3 volumes of borate buffer.

Bovine plasminogen. For studying the effect of bovine plasminogen concentration in the proposed technique, freeze-dried fraction B2, 3 (1) was dissolved in borate buffer and incorporated in bovine fibrinogen fraction I-4 E.

Plasma samples were obtained by cold centrifugation from blood (2.8 ml collected in 16% sodium citrate dihydrate (0.2 ml) and used once or stored at -20°C . 'Normal' plasma pools were constituted by mixing plasma samples from at least 10 bloodbank donors.

All chemicals used were of AR grade unless otherwise state.

Methods

Prepared assay method (routine performance) A twofold dilution series of plasma is set up in a number of 0.8 x 11 cm glass tubes in melting ice and containing measured

Personal communication by Dr. MAYER and checked in our laboratory

amounts of cold borate buffer. To the first tube, containing 2 ml of buffer, is added 0.2 ml of chilled plasma. From this mixed solution 1 ml is transferred to the second tube containing 1 ml of buffer; the pipet is blown-out in a piece of absorbing paper and used for mixing the solution by repeated aspiration. Subsequently progressive 1 ml dilutions are similarly transferred to each next tube containing 1 ml buffer. For normal plasma samples 8 to 10 similar successive dilution steps are made. Thus the plasma dilution in the tubes is respectively 1:11, 1:22, 1:44, etc. Starting with the lowest concentration 0.2 ml portions are immediately transferred to chilled empty 0.8×11 cm testtubes. As the clots will have a final volume of 1 ml, they will constitute a plasma dilution series of 1:55, 1:110, 1:220, etc. To each 0.2 ml portion is added 0.2 ml chilled streptokinase solution, containing 8000 units SK per ml of borate buffer, and 0.5 ml of bovine fibrinogen solution of proper concentration made-up in borate buffer. To each single tube is added 0.1 ml of thrombin solution containing 20 NIH units/ml. The tube is taken out of the melting ice and swirled during 10 sec at high frequency in a mixing-machine (Supermixer Lab-Line Instruments, Inc. or Vortex Mixer Scientific Industries, Inc.) This results both in adequate mixing and maximal air incorporation in the solution. The tube is then put at once in a 37°C transparent waterbath, when stopwatch is started. The thrombin addition and mixing are repeated for the next tubes so as to start their incubation at 30 sec intervals, as indicated by the stopwatch. During the warming-up of the incubate, gas solubility decreases, resulting into airbubble formation and trapping in the solid clot. As clot lysis proceeds parallel with viscosity decrease, airbubble trapping ceases when an appropriate state of liquefaction is attained. Lysis endpoint time is read from the stopwatch at the moment the bulk of the rising airbubbles attains the meniscus. Tubes are continuously inspected or, at least, every 30 sec, between the tenth and the fortieth min of the incubation time. As airbubbles may adhere to the glass or to isolated fibrin fibres, often formed when thrombin addition and mixing are performed too roughly, the tubes, which are at about lysis endpoint, are flicked every 30 sec. The recorded times are corrected for delay at the start and plotted on a double-logarithmic graph, versus the reciprocal of the plasma dilution in the considered tube. The plasminogen level of the analysed plasma is read from the 30 minute intercept on the best fitting straight line joining the experimental points (Fig. 1). When a lowered plasminogen level is to be expected in the test-sample, as it occurs during streptokinase administration, a low number of dilutions is needed or a lower dilution factor is selected. Instead of this time-consuming and approximate serial dilution, constant microtitre amounts of plasma may be pipetted with Levy-Lang constriction pipets into variable volumes of chilled buffer.

Caseolytic method. Plasminogen in human plasma was assayed as plasmin formed in the presence of optimal amounts of SK. (6) Human plasma (50 μ l) is incubated at 37°C and pH 7.4 in 2.45 ml Na phosphate 0.1 M-NaCl 0.15 M (70:30) containing 1.6% (w/vol.) casein (white soluble casein, British Drug Houses Ltd., acid precipitated and degassed by ether and ethanol extraction) and 75 units SK. Degrations are interrupted after 5 min (blank) and 65 min by adding 2.5 ml of redistilled trichloroacetic acid 10% (w/vol.). After standing for 1 hour at room temperature, the precipitate is spun down by centrifugation and the supernatants are collected by filtration through Schleicher & Schüll paper no. 595. The solubilized peptides are assayed in the Auto-Analyzer (R) by the Lowry method in comparison to bovine serumalbumin standards. The results are expressed as serumalbumin values, after subtraction of the blank reading (6).

Estereolytic method. Plasminogen in human plasma was assayed as esterase formed in the presence of optimal amounts of SK. (6) Human plasma (1.0 μ l) is incubated at 37°C and pH 8.5 with 2.85 ml TRIS 0.33 M-NaCl 0.15 M (1:1) containing 13.5 mM p-toluene sulphonyl arginine methyl ester HCl (H. M. Chemical Co., Ltd. Santa Monica, Calif.) and 5000 units SK. Hydrolyses are interrupted after 5 min (blank) and 65 min by

adding 1 ml of redistilled trichloroacetic acid 15% (w/vol.) The precipitates are spun down by centrifugation and the supernatants are assayed for residual ester by the Harris (7) procedure in the Auto-Analyser (R) (6). The results are expressed in micromoles of ester hydrolysed during 60 min in the test.

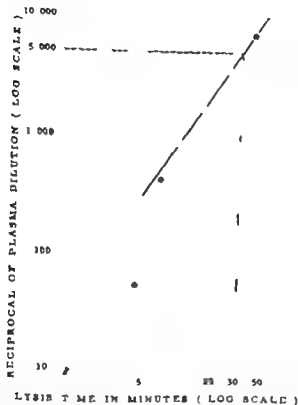


Fig 1 Double logarithmic plot of lysis times in minutes against reciprocals of plasma dilution. Conditions in this experiment are 'normal' pooled human plasma, 37°C, barate buffer of pH 7.5 and $I = 0.2$, and, per ml clot, 1600 units SK, 3.0 mg fibrinogen Povid and 2 units of thrombin

Results

Influence of Assay Conditions on the Sensitivity of the Method

Several variables pertaining to the bovine clot lysis assay and to the test system were investigated. By interpolation from a double logarithmic plot of lysis times versus reciprocals of corresponding plasma dilutions, the normal human plasma dilutions inducing a 30 minute lysis time were determined. If the extent of these dilu

tions increased or decreased, it was concluded that the technique had become more or less sensitive. All parameters of the assay system except for one variable were kept constant.

When thrombin concentration in the clot is varied between 1 and 20 units per ml, the coefficient of variation of the plasma dilution value causing a 30 minutes lysis time is under 0.05. This value is what is to be expected from the fidelity of the assay itself. If thrombin concentrations below one unit per ml clot are used, no firm clot is obtained and assay values are erratic. The influence of streptokinase concentration in the clot was studied in the range of 100 to 6400 units per ml. The results reported in Fig. 2 show an optimal concentration starting from 1600 units per ml clot on.

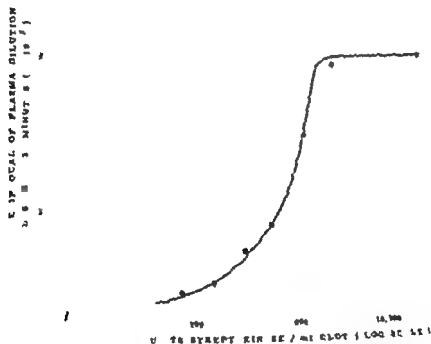


Fig. 2 Influence of streptokinase concentration on the sensitivity of the assay

The influence of the plasminogen, insensitive to streptokinase, was investigated by enriching the clot prior to its formation, in bovine plasminogen. No effect was noted when plasminogen-containing bovine fibrinogen was used. This applies to the commercial fibrinogen preparations used as well as to fraction 1.4. However

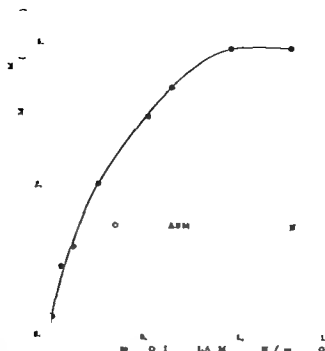


Fig. 3. Influence of bovine plasminogen concentration on the sensitivity of the assay. Prior to clotting, plasminogen-free bovine fibrinogen (fraction I 4 E) is enriched with variable amounts of purified bovine plasminogen (fraction B 2, 3).

when plasminogen-free bovine fibrinogen fraction I 4 E was enriched with bovine plasminogen fraction B 3 as shown in Fig 3 the sensitivity increased from virtually 0 i.e. stability of the clot over 8 h, to a value identical to those obtained with plasminogen containing bovine fibrinogen of the original fraction I 4 batch.

The effect of temperature on the sensitivity of the assay is shown in Fig 4. An optimum is observed between 35 and 37°C. It may be mentioned that, above the latter temperature, straight double logarithmic plots are no longer obtained. The slope of the curves diminishes when lysis times increase. The effect of the borate buffer pH is summarized in Table I.

An increase of sensitivity is observed for decreasing pH values of the borate buffer. The effect of the ionic strength was studied by varying the NaCl concentration only. The results reported in Table II show a sensitivity increase for decreasing ionic strength.

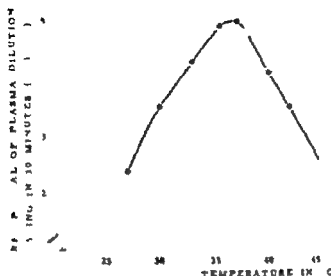


Fig 4 Influence of temperature during incubation on the sensitivity of the assay

Table I

Effect of pH of the borate buffer on the sensitivity of the assay. Conditions are: borate buffer of $I = 0.2$, temperature of 37°C , 1600 units SK, 5.0 mg fibrinogen Parvet and 2 units thrombin per ml clot.

pH	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
7.2	6000
7.3	5700
7.4	5400
7.5	5000
7.6	4500
7.7	3300
7.8	2900

Table II

Effect of the ionic strength (I) on the sensitivity of the assay (mean values of triplicate assays). Conditions are: per ml clot 1600 units SK, 8.5 mg fibrinogen Armour and 2 units thrombin; temperature of 37°C and borate buffer of pH 7.5 and $I = 0.043$ adjusted to proper ionic strength by addition of NaCl.

Ionic strength	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
0.04	5700
0.09	5300
0.13	5000
0.19	5100
0.24	1900
0.34	1000

It should be mentioned that, below I values of 0.2, fibrinogen solutions tend to become unstable as evidenced by increasing turbidity upon standing while at I values above 0.2 spontaneous air bubble formation in the clot is greatly reduced.

When the bovine fibrinogen concentration is gradually increased in the test clot, the sensitivity of the assay decreases. It was investigated whether the Michaelis-Menten equation is applicable to this substrate dependence. Only a partial state of substrate proteolysis is attained at the viscosimetric endpoint for lysis time evaluation. Therefore the velocity value, calculated by dividing the fibrinogen concentration in the considered clot by the lysis time caused by a same human plasma dilution, was taken as an expression of the initial velocity. Thus the ratio of initial velocity over substrate concentration is given here by the reciprocal of the lysis times. The plot according to HORSTEE (8) of the reaction velocities against the reciprocal of the lysis times yields a straight line as shown in Fig. 5.

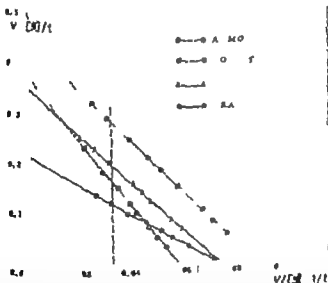


Fig. 5. Linear plot according to Horstee (8) of reaction velocity (fibrinogen concentration divided by the lysis time) against reaction velocity divided by the fibrinogen concentration (reciprocal of the lysis time). Each one ml clot contains 2×10^{-4} ml human plasma, i.e. 5000 fold dilution. From the intercepts with the Y and X axes respectively are read the maximal velocity (V_{max}) and maximal velocity divided by the Michaelis constant (V_{max}/K_m). From the intercept with the dotted vertical line, intersecting the X-axis at the reciprocal of 30 minutes, the velocity value is read which corresponds to lysis time of 30 minutes.

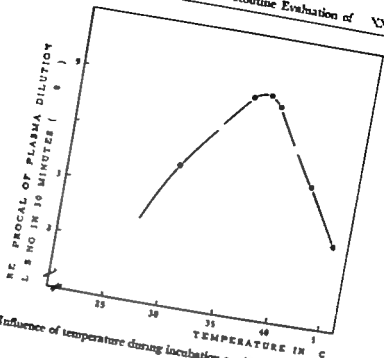


Fig 1 Influence of temperature during incubation on the sensitivity of the assay

Effect of pH of the borate buffer on the sensitivity of the assay. Conditions are borate buffer of $I = 0.2$, temperature of 37°C , 1600 units SK_{12} , 5.0 mg fibrinogen Parvet and 2 units thrombin per ml clot.

Table I

pH	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
7.2	
7.3	6000
7.4	5700
7.5	5400
7.6	5000
7.7	4500
7.8	3900
	2900

Table II

Effect of the ionic strength (I) on the sensitivity of the assay (mean values of triplicate assays). Conditions are per ml clot 1600 units SK_{12} , 8.5 mg fibrinogen Armour and 2 ar or thrombin temperature of 37°C and borate buffer of pH 7.5 and $I = 0.043$ adjusted to proper ionic strength by addition of NaCl .

Ionic strength	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
0.04	5700
0.09	5300
0.15	5300
0.19	5100
0.24	1900
0.34	1000

It should be mentioned that, below I values of 0.2 fibrinogen solutions tend to become unstable as evidenced by increasing turbidity upon standing while at I values above 0.2 spontaneous air bubble formation in the clot is greatly reduced.

When the bovine fibrinogen concentration is gradually increased in the test clot, the sensitivity of the assay decreases. It was investigated whether the Michaelis-Menten equation is applicable to this substrate dependence. Only a partial state of substrate proteolysis is attained at the viscosimetric endpoint for lysis time evaluation. Therefore the velocity value, calculated by dividing the fibrinogen concentration in the considered clot by the lysis time caused by a same human plasma dilution, was taken as an expression of the initial velocity. Thus the ratio of initial velocity over substrate concentration is given here by the reciprocal of the lysis times. The plot according to HORRIGZ (8) of the reaction velocities against the reciprocal of the lysis times yields a straight line, as shown in Fig. 5

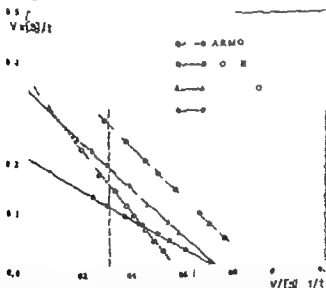


Fig. 5 Linear plot according to HORRIGZ (8) of reaction velocity (fibrinogen concentration divided by the lysis time) against reaction velocity divided by the fibrinogen concentration (reciprocal of the lysis time). Each one ml clot contains 2×10^{-4} ml human plasma, i.e. 5000 fold dilution. From the intercepts with the Y and X axis respectively are read the maximal velocity (V_{max}) and maximal velocity divided by the Michaelis constant (V_{max}/K_m). From the intercept with the dotted vertical line, intersecting the X-axis at the reciprocal of 30 minutes, the velocity value is read which corresponds to lysis time of 30 minutes.

of the caseinolytic and esterolytic assays is only down to 5% of the normal human plasminogen level. The fidelity of the assays can be deduced from the average deviations from the mean of each result.

Table II

Comparison of the proposed assay to caseinolytic assays with respect to sensitivity

Normal plasmin in the test	Proposed assay Plasminogen units	Caseinolytic Serum/plasma values (80 min digestion)	Esterolytic $\mu\text{M ester hydro-}$ $\text{lysed } 60 \text{ min}^{-1}$
Undiluted	5000 ± 200	296 ± 2	23.7 ± 0.2
50%	2500 ± 100	142 ± 2	11.8 ± 0.2
10%	500 ± 30	28 ± 3	1.8 ± 0.3
5%	100 ± 10	15 ± 3	0.7 ± 0.3
1%	50 ± 10	0	0
0.5	25 ± 5	0	0

With respect to this property the proposed assay only behaves favourably at low plasminogen levels

Discussion

The assay of human plasminogen in the described system, based on a two step reaction sequence, exhibits two major advantages. The required equipment and the reagents are easily available and generally present in a blood coagulation laboratory or in a unit dealing with fibrinolytic experimentation. The sensitivity is very high and allows quantitation of human plasminogen concentrations below 0.5% of the normal level. From comparisons with caseinolytic and esterolytic assays it appears that the bovine clot lysis system is to be preferred for low proenzyme levels while the chemical techniques result into more sensitivity and fidelity at levels around the normal range. It should be mentioned that the extensive dilution of the test plasma rules out possible interference by plasma fibrinolytic inhibitors.

Several parameters pertaining to the assay and to the test system have been investigated. The thrombin the streptokinase and the bovine plasminogen concentrations are not critical as far as they are incorporated in sufficient amounts. According to the results reported in figure 2, 1600 units of SK are incorporated in

a test clot containing about $2 \cdot 10^{-4}$ ml of normal plasma. Thus it may be calculated that an amount of SK of the order of 8 megaunits is used for activating 1 ml of normal plasma. When using 50 times less SK, as proposed by BLIX (3) the clot lysis assay was found unsatisfactory. Caseinolytic experiments showed that maximal in vitro formation of activator in normal human plasma only occurs when at least 4 megaunits of SK are present per ml of plasma (6). The pH value, the ionic strength, the temperature, and the bovine fibrinogen concentration, however are critical. A pH value of 7.5 is selected so as to match with sensitivity and buffer properties. The buffer nature has not been dealt with in the present study. Other buffers could be used but would lead to other assay conditions. An ionic strength of 0.2 is selected, which matches with sensitivity ease of performance, and solubility of the bovine fibrinogen. The 37°C temperature is selected in an optimum sensitivity zone and preferred as it is the working temperature in many blood coagulation and fibrinolysis tests. The concentration of bovine fibrinogen, acting as precursor of both the substrate (fibrin) and of the final enzyme (plasmin) has been selected as the unique variable for controlling the standardization of the assay. Indeed the sensitivity is inversely proportional to the fibrinogen concentration. Hence the bovine fibrinogen in the test was selected so that one unit of human plasminogen, maximally activated with SK, would cause the test clot to lyse in exactly 30 min. To normal human plasma was assigned a plasminogen content of 5000 units per ml.

From the data on the relation between bovine fibrinogen concentration to sensitivity an obedience to the Michaelis-Menten equation was observed. This applies if fibrinogen concentration is taken for substrate concentration. Such finding primarily corroborates the non-critical influence of the bovine plasminogen in the test. It may also be concluded that the clot lysis assay follows a simple kinetic law. This implies that the viscosimetric lysis endpoint only corresponds to a partial proteolysis state of the fibrin substrate. The same relation leads to the evaluation of kinetic constants among which the Michaelis constant and maximal velocity were calculated for a few fibrinogen preparations. Finally the desired fibrinogen concentration for particular batches may be easily computed from these constants or interpolated from linearized plots.

Both highly purified and commercial bovine fibrinogens are suitable substrates. Fraction I 4 is preferred for stability upon

keeping and ease of handling. Commercial preparations however are more easily obtainable in every laboratory but do not possess the above mentioned advantages. Ultimate care should be taken that the reagent be adequately and reproducibly dissolved. This applies especially for fibrinogen Behring while the dissolution of fibrinogen Armour causes no problem. The stability of the solutions is a limiting factor to their keeping qualities. Fibrinogen Behring is the most stable while both the Armour and Povet products deteriorate within 4 hours. Besides, the latter precipitates rapidly if kept at low temperature. No commercial preparation was found suitable for large batch dissolution to proper strength and keeping in the frozen state as is routinely done with bovine fraction I 4 Bovine plasma, which might have been convenient (3) and easily obtainable had to be disregarded because to personal experience its sensitivity in the test decreases progressively during storage even in the frozen state. Finally it should be pointed out that the proposed assay technique has been used on many occasions for following the plasminogen level during SH therapy in humans (13). A SH administration scheme could with success be based on these plasminogen figures (12). The high incidence of thrombolytic success obtained with this scheme is an indirect proof of the clinical usefulness of the described plasminogen assay method.

Acknowledgments: The author is much indebted to ARLETTE VERHAEGEN and FRANK FLETER for skilful assistance. Helpful discussions with Dr ALAN J. JOHNSON of New York University are gratefully acknowledged. Habbema (R) has been supplied to the laboratory in liberal amounts by AB KABI Stockholm, through Missen A. Christens S. A. Bromel. This investigation has been aided by the Fonds voor Wetenschappelijk Geneeskundig Onderzoek through grants to Prof. J. Vandenbroucke and M. Verstraet.

Summary

The performance details are described of a technique for routine evaluation of plasminogen in humans. In a CARRINGTON clot lysis type of assay the human plasminogen is converted into activator which transforms bovine plasminogen into plasmin. The parameters pertaining to the reagents and conditions of the assay are investigated. Kinetic data have been obtained concerning fibrin clot dissolution induced by activated human plasminogen. A standardization of the assay is presented based on an assumed plasminogen content in normal plasma of 5000 units per ml and on the obedience of the kinetics to the MICHAELIS-MENTEN equation. The sensitivity and fidelity of the described technique and of euglobulin and euglobulinolytic assays are compared. The technique has been routinely and satisfactorily applied during thrombolytic experiments in humans with streptokinase.

Résumé

Une méthode pour la détermination de routine d'un taux de plasminogène chez l'homme est décrite en détails. Dans une épreuve de lyse du caillot selon CARSTRÖM le plasminogène humain est converti en un activateur qui transforme le plasminogène bovin en plasmine. L'influence des réactifs et des conditions expérimentales sont étudiées. Des données cinétiques ont été obtenues concernant la dissolution du caillot de fibrine, dissolution induite par du plasminogène humain activé. Une standardisation de l'épreuve est présentée qui est basée sur un taux plasmatique présumé être de 5000 unités par ml dans le plasma normal et sur la supposition que la cinétique de l'épreuve suit l'équation de MICHAELIS-MENTEN. La sensibilité et la sûreté de l'épreuve sont comparées à celles des méthodes de catinolyse et d'esterolyse. La méthode a été employée avec succès dans des cas de thrombolyse effectués chez l'homme à l'aide de streptokinase.

Zusammenfassung

Es werden die methodischen Details eines Verfahrens zur Routinebestimmung von Plasminogen beim Menschen beschrieben. Nach Art der Bestimmung der Gerinnungszeit nach CARSTRÖM wird menschliches Plasminogen in den Aktivator übergeführt, der bovinen Plasminogen in Plasmin umwandelt. Die Einflüsse der Reagentien und der Versuchsbedingungen wurden analysiert. Über die Auflösung von Fibrinpräparaten durch aktiviertes menschliches Plasminogen wurden kinetische Daten ermittelt. Es wird eine Standardisierung des Verfahrens angegeben unter der Annahme eines Plasminogengehaltes in normalem Plasma von 5000 Einheiten und unter der Voraussetzung, daß die Kinetik nach der Gleichung von MICHAELIS-MENTEN erfolgt. Die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens werden verglichen mit denjenigen der katalytischen und der esterolytischen Methoden. Bei thrombolytischen Versuchen mit Streptokinase am Menschen wurde das Verfahren routinemäßig und mit gutem Erfolg angewendet.

References

1. BERNTSON, K. Purification of bovine plasminogen. *Arkiv Kemi* 21: 517-554 (1963).
2. BERNTSON, K. AND WALLIN, P. Removal of contaminating plasminogen from purified bovine fibrinogen. *Arkiv Kemi* 17: 505-511 (1961).
3. BIRK, S. The proactivator of the fibrinolytic system in human plasma. The quantitative determination and its clinical application. *Acta med. scand.* 177: 93-98 (1965).
4. BLOMBERG, B. AND BLOMBERG, M. Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv Kemi* 10: 413-443 (1956).
5. CARSTRÖM, L. R. Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system, and streptococcal deoxyribonuclease. *J. clin. invest.* 38: 163-172 (1949).
6. DE VRIES, R. A. Assay of parameters related to plasminogen activation. Xth Congr. Int. Soc. Haemat., Stockholm 1964—Assay of fibrinolytic parameters by semiautomatic techniques. Automation in the analytical chemistry. Int. Technicon Symp., Frankfurt a. Main 1964. 523-529.
7. HIRSH, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical applications. *J. Biol. Chem.* 180: 249-261 (1949).

8. HORSTEL, H. H. J.: Graphical analysis of single enzyme systems. *Enzymologia* 17 273-278 (1956)
9. JOHNSON, A. J.: (pers. commun. 1963)
10. JOHNSON, A. J. AND MCCARTY W. R.: The lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of streptokinase. *J. clin. Invest.* 38 1627-1643 (1959)
11. JOHNSON, A. J. AND TELLEY W. S.: The lysis in rabbits of intravascular blood clots by the streptococcal fibrinolytic system (Streptokinase). *J. exp. Med.* 95 449-464 (1952)
12. VERSTRAETE, J. L.; AUBRY A.; VERMYLEN, J.; VERMYLEN, C. AND DE VREESE, R. A.: Practical method for thrombolytic treatment with streptokinase. Maintenance of nearly complete plasminogen depletion associated with high circulating activity. *Brit. med. J.* 675-676 (1964)
13. VERSTRAETE, J. L.; VERMYLEN, J.; DE VREESE, R.; AUBRY A. AND VERMYLEN, C.: Efficacy of thrombolytic therapy with streptokinase using a new administration scheme. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 16, Suppl. 92 15-22 (1964).

Author address: Dr R. A. De Vries, The Laboratory of Blood Coagulation and Fibrinolysis, Kapucijnenvoer 33, Leuven (Belgium).

Department of Clinical Medicine of the University of Pavia
(Dir. Prof. M. LERGOZZI)

Chloramphenicol and Erythropoiesis

E. G. RONDANELLI, P. GORINI AND E. MAGLIULO

The development of an irreversible and fatal aplastic anaemia was reported by some authors (15-11) following chloramphenicol administration. However a mild and reversible bone marrow depression seems to occur more frequently (14-3, 10, 6, 11-12). Generally excessive doses had been employed, and for prolonged periods of time.

In order to investigate the effect of chloramphenicol on erythropoiesis, studies were carried out on the maturation and proliferation of human and animal erythropoietic cells. Care was taken to employ doses or concentrations of the drug not exceeding those normally found in clinical practice.

Materials and Methods

Studies on human subjects. Bone-marrow samples were obtained by sternal puncture from 4 healthy subjects receiving chloramphenicol (Chemiclerina Erba) at daily dose of 2 grams during 1 week, and from other 4 subjects who did not receive any treatment before the experiment. With part of bone-marrow particulate slides were prepared, which were stained with May-Grunwald-Giemsa. Mitotic indices were determined on the slides by counting the number of mitoses/1000 cells in basophil (proerythroblasts included), polychromatophil and total erythroblasts. At least 4000 cells were counted for every subject. The remaining samples of bone-marrow were cultured in liquid media for maturation studies (4 cultures for every subject) and in plasma clot for proliferation studies, (also 4 cultures for every subject) according to the methods developed by ARNALDI *et al.* (1-2). Maturation *in vitro* was studied by observing the rate of disappearance of more immature cells in the medium, i. e. the relative frequency of cells in every maturation stage at several hours after the onset of the culture. Proliferation was studied by the colchicine stathmokinetic method of ARNALDI, by counting mitotic blocks/1000 cells during a period of 12 hours (3).

Studies on the chronology of mitosis in trilineal erythropoietic cells *in vitro*. Slide cultures in Leighton tubes were prepared with spleen fragments from Tritons (*Molge vulgaris* L.) according to the method of RONDANELLI *et al.* (1961). When suitable growth was obtained the medium was substituted with fresh medium containing 60% of Chloramphenicol. After 12 hours the duration of mitosis and its phases was measured under

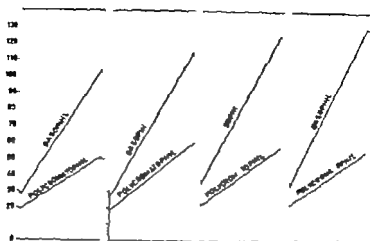


Fig. 3. Stathmokinetic indices. a) Erythroblasts from treated subjects in autologous plasma. b) Erythroblasts from treated subjects in plasma of untreated subjects. c) Erythroblasts from untreated subjects in plasma of treated subjects. d) Controls.

that this was based on exact estimates of maturation times and these were obtained by averaging more data. In effect the disappearance time of erythroblasts in some cultures fell within normal limits, which makes the maturative slowing-down not systemic.

2. *Proliferation* (Tables I and II Fig 2 and 3) The average mitotic indices of basophil, polychromatophil and total erythroblasts in treated subjects appear lower than in the controls (Table I). The incidence (every 100 mitoses) of metaphase is slightly higher after chloramphenicol (Fig 2). The average stathmokinetic index (Table II and Fig 3) of basophil erythroblasts (including proerythroblasts) is lower in marrow from treated patients when cultured in autologous plasma. When cultured in normal plasma, basophil erythroblasts do not display any decrease in stathmokinetic index, as well as erythroblasts from untreated subjects cultured in plasma from treated patients. The average stathmokinetic index of polychromatophil erythroblasts from treated subjects is lower than normal only in autologous plasma. The statistical analysis of proliferation data in humans yielded the following results

a) Comparison between mitotic indices in

Total erythroblasts Student's $t = 0.97$ ($P > 0.05$)

Basophil erythroblasts Student's $t = 1.77$ ($P > 0.05$)

Polychromatophil erythroblasts Student's $t = 0.49$ ($P > 0.05$)

b) Comparison between stathmokinetic indices

Basophil erythroblasts Student's $t = 1.91$ ($P > 0.05$)Polychromatophil erythroblasts Student's $t = 0.06$ ($P > 0.05$)

c) Comparison between metaphase incidences (every 100 mitoses)

Basophil erythroblasts $\chi^2 = 1.96$ ($P > 0.05$)Polychromatophil erythroblasts $\chi^2 = 2.84$ ($P > 0.05$)

The statistical analysis then shows that differences observed in mitotic and stathmokinetic indices, and in metaphase incidence between treated and untreated subjects are not statistically significant.

Studies on the Chronology of Mitosis in Triton Tissue Cultures

In triton erythroblasts treated with 60 γ /ml of chloramphenicol mitosis lasts longer than in the control (Tables III-VI). The increase in duration of mitosis is more marked in basophil than in polychromatophil erythroblasts and appears in dependence of an increased duration of metaphase and, at a lesser degree, of anaphase. No morphological anomalies of the course of mitosis were observed. The statistical analysis yielded the following results:

Comparison between basophil erythroblasts Student's t $= 2.06$ ($P > 0.05$)Comparison between polychromatophil erythroblasts Student's t $= 1.26$ ($P > 0.05$)

The difference observed are thus not statistically significant.

Table III

Duration of mitosis and its phases in untreated triton basophil erythroblasts.

Mitosis No.	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	12' 46"	59' 48"	13' 10"	18' 49"	104' 33"
II	20' 03"	49' 11"	16' 30"	13' 05"	98' 49"
III	28' 02"	63' 01"	20' 08"	14' 58"	126' 09"
IV	24' 48"	59' 12"	17' 18"	16' 10"	117' 28"
V	18' 07"	52' 24"	16' 18"	19' 21"	106' 10"
VI	18' 33"	61' 03"	18' 02"	15' 08"	113' 46"
VII	32' 12"	56' 36"	19' 26"	18' 07"	126' 21"
VIII	24' 52"	72' 01"	16' 17"	14' 37"	127' 47"
IX	24' 51"	50' 01"	15' 31"	20' 43"	111' 06"
X	22' 04"	56' 13"	16' 40"	11' 20"	106' 17"
Average	22' 44"	58' 09"	17' 08"	16' 14"	114' 15"

Table IV

Duration of mitosis and its phases in untreated triton polychromatophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	20' 50"	64' 22"	26' 02"	23' 24"	152' 58"
II	21' 52"	69' 23"	25' 48"	19' 58"	156' 59"
III	18' 07"	73' 34"	20' 22"	19' 16"	131' 19"
IV	30' 14"	82' 21"	22' 30"	18' 15"	153' 20"
V	32' 11"	78' 25"	25' 27"	16' 16"	150' 19"
VI	26' 55"	74' 47"	22' 38"	19' 22"	143' 40"
VII	24' 02"	81' 08"	24' 49"	25' 07"	153' 06"
VIII	26' 51"	79' 03"	24' 01"	18' 09"	148' 04"
IX	29' 48"	80' 14"	33' 04"	17' 35"	160' 39"
X	24' 42"	78' 53"	18' 19"	15' 02"	136' 36"
Average	25' 53"	76' 11"	25' 00"	18' 50"	145' 34"

Table V

Duration of mitosis and its phases in treated triton basophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	19' 01"	64' 43"	18' 26"	22' 10"	118' 22"
II	18' 56"	68' 49"	19' 02"	17' 58"	124' 45"
III	19' 15"	58' 50"	20' 08"	25' 08"	114' 49"
IV	22' 12"	61' 51"	22' 05"	19' 57"	125' 24"
V	30' 04"	77' 08"	19' 58"	24' 51"	151' 59"
VI	18' 10"	63' 02"	15' 51"	16' 20"	113' 03"
VII	22' 15"	55' 55"	20' 27"	18' 50"	117' 27"
VIII	22' 41"	66' 13"	15' 46"	16' 10"	118' 50"
IX	24' 07"	61' 11"	15' 47"	20' 29"	121' 34"
X	25' 12"	74' 48"	18' 20"	18' 27"	157' 47"
Average	20' 56"	63' 10"	18' 21"	19' 34"	124' 24"

Table VI

Duration of mitosis and its phases in treated triton polychromatophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	24' 58"	81' 02"	28' 01"	21' 42"	155' 23"
II	26' 36"	82' 19"	25' 49"	24' 51"	159' 35"
III	26' 22"	79' 33"	25' 02"	26' 53"	157' 50"
IV	30' 21"	78' 42"	18' 58"	18' 03"	146' 04"
V	21' 11"	72' 48"	28' 20"	19' 08"	141' 27"
VI	25' 47"	84' 13"	27' 25"	21' 21"	158' 46"
VII	22' 49"	78' 00"	30' 13"	27' 54"	158' 36"
VIII	24' 09"	75' 55"	18' 07"	17' 35"	135' 44"
IX	18' 59"	67' 16"	17' 21"	21' 07"	124' 43"
X	30' 58"	88' 04"	21' 24"	22' 26"	162' 22"
Average	25' 09"	78' 35"	25' 52"	22' 04"	149' 40"

Discussion

Not many reports have been published on the action of chloramphenicol on human and animal cells. FUSILLO *et al.* (9) and POSERAT AND LEAKE (13) reported that tissue cultures are resistant to even high concentrations of chloramphenicol. Inhibition of respiration of leukocytes *in vitro* (8) inhibition of DNA and RNA synthesis in isolated thymic nuclei (5) and in bone marrow cells *in vitro* (16) and suppression of iron uptake and utilization in bone-marrow-cells *in vitro* (7) have been reported for drug levels which however are far above the usual therapeutic range (not exceeding 40 γ /ml). The studies presented here indicate that chloramphenicol when acting on red cell precursors in quantities and within times compatible with its therapeutic effectiveness, does not induce changes of maturation and proliferation potentials which could involve significative relations between the drug and erythropoietic suppression.

Summary

In order to investigate the effect of chloramphenicol on erythropoiesis, studies were carried out on the maturation and proliferation of human and animal erythropoietic cells. The results indicate that chloramphenicol, when administered for not prolonged periods of time at doses not exceeding those therapeutically effective, does not cause significative alterations of maturation and proliferation of erythropoietic cells.

Résumé

Afin d'étudier les effets du chloramphénicol sur l'érythropoïèse, nous avons étudié la maturation et la prolifération de cellules érythropoïétiques humaines et animales. Les résultats démontrent que le chloramphénicol ne provoque pas d'altération significative de la maturation et de la prolifération des cellules érythropoïétiques s'il est administré pendant un temps prolongé ni à des doses dépassant celles nécessaires à une thérapeutique efficace.

Zusammenfassung

Um die Wirkung von Chloramphenicol auf die Erythropoese zu untersuchen, wurden Reifung und Proliferation menschlicher und tierischer erythropoetischer Zellen beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, daß Chloramphenicol, wenn es nicht über längere Zeit und in Mengen, die die therapeutisch wirksamen Dosen nicht überschreiten, verabfolgt wird, keine signifikanten Veränderungen von Reifung und Proliferation erythropoetischer Zellen herbeiführt.

References

1. ASTALDI, G. e MAURI, C. La valutazione dell'attività proliferativa delle cellule midollari. Studio III su un «test statistico» *Haematologica* 33: 3 (1949).
2. ASTALDI, G. AND TOLLEYDO, P. Studies in vitro on the restoration of erythroblasts in normal and pathological conditions. *J. clin. Path.* 2: 217 (1949).
3. BALDOCHI, E.: Sulla terapia del tifo addominale con cloramfenicolo. *G. Mal. inf. paras.* 1: 310 (1949).
4. BJÖRNUM, S. E.: Case of aplastic anemia caused by chloramphenicol with recovery after 12 months. *Acta haemat.* 27: 124 (1962).
5. BREITMAN, T. R. AND WINTER, O. C.: Effect of chloramphenicol on protein and nucleic acid synthesis in isolated thymus nuclei. *Biochem. biophys. Acta* 27: 408 (1958).
6. EARLEY, A. S.: Hematopoietic depression induced by chloramphenicol. *Blood* 4: 170 (1955).
7. EARLEY, A. S. AND JOHNSON, S. A. In vitro action of chloramphenicol and chloramphenicol analogues on the metabolism of human immature red blood cells. *Acta haemat.* 29: 1 (1963).
8. FOLLETT, S. H. SINGHAR, P. M.; REYNOLDS, E.; VALENTINE, W. V. AND LAWRENCE, G. S. The effect of chloramphenicol and other antibiotics on leukocyte respiration. *Blood* 11: 234 (1956).
9. FUSILLO, M. H. MATTHEWS, J. F. AND KUTCH, D. M.: Effect of chloramphenicol and streptomycin on embryonic tissue growth in in vitro cultures. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 79: 376 (1952).
10. GIULI, G. e SCOD, G. T. Sul comportamento della crisi ematica in anemici di malattia trattati con cloramfenicolo. *Riv. Fa.-Clin. Terapia* 22: 1075 (1950).
11. HODGKINSON, R. Blood dyscrasias associated with chloramphenicol. *Lancet* 1: 285 (1954).
12. KÄRLE, H. G. Kritische Beurteilung der Bluterkrankungen nach Anwendung von Chloramphenicol (Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1962).
13. PONDÉRAY, C. M. AND LEASE, C. D. Short term cultures for drug assays: General considerations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 58: 1110 (1954).
14. SCARZELLA, M. Su alcuni casi di tifo trattati con acetamidina cloramfenicolo. *Min. Med.* 10: 875 (1949).
15. SHELLEY, R. K. CARTWRIGHT, G. E. AND WINTROBE, M. M. Fetal aplastic anemia following chloramphenicol (chloramphenicol) administration. *J. Amer. med. Ass.* 158: 914 (1952).
16. YOUNG, O. A. AND HARRINGTON, W. S. Patterns of inhibition by chloramphenicol of nucleic acids in human bone marrow and leukemic cells. *J. Lab. clin. Med.* 55: 851 (1960).

Authors' address: Prof. E. G. Rondanini, Dr. P. Grinti and E. Maggiolo, Dept. of Clinical Medicine, Univ. of Pavia, Pavia (Italy).

determination was carried out on the haemolysates prepared by adding to one volume of red cells, previously washed three times in saline, four volumes of distilled water and then freezing and thawing three times. The volume of red cells was measured after centrifugation at 4000 r.p.m. for 10 min. In the patients with thalassaemia, cases of thalassaemia major and cases of thalassaemia minor were included.

The enzymatic activities determined and the number of subjects investigated are shown in Table I.

HK was measured according to CHAPMAN *et al.* (24) PHI according to BATES and HENDERSON (25) PFK according to LLOYD *et al.* (26), aldolase according to BATES (27), TIM according to MYRZA-AKSEYI *et al.* (28) utilizing the reaction 3-phosphoglyceraldehyde \rightarrow dihydroxyacetone phosphate, GAPDH according to VANCE (29), PGK according to BÉCKER (30) utilizing the reaction 3-phosphoglycerate \rightarrow 1,3-diphosphoglycerate, PTM and enolase according to CHAPMAN *et al.* (24) PK according to BÉCKER and FLEISCHER (31), LDH according to WROBLEWICK AND LA DICK (32) GDH according to SCHMIDT *et al.* (33) fumarase according to RACKER (34) MDH was determined by method (35), based on the spectrophotometric measurement of the DPNH oxidation. G6PDH and 6PGDH was measured according to MARSH (36) GOT according to KARMAN (37) GPT according to WROBLEWICK AND LA DICK (38) arginase by a modified method of HOFFER AND DARTRECHER as we have elsewhere reported (39) AcPase according to ANDERSON AND SPECTORNIK (40).

All activities have been reported in μ moles of transformed substrate in one minute from one ml of haemolysate, prepared as mentioned above. The reticulocyte count was performed after staining with brilliant cresyl blue, and the coefficient of correlation between enzymatic activity and percentage of reticulocytes was calculated. The results were statistically analysed.

Results

From Table I it can be seen, that in the red cells of patients with thalassaemia there was a statistically significant increase of almost all the enzymatic activities studied, with the exception of PFK, GDH and AcPase which were normal. In patients with thalassodrepanocytosis the increase concerns a smaller number of enzymes, namely HK, PHI aldolase, GAPDH, PK, LDH, G6PDH, 6PGDH, MDH, GOT GPT and arginase, while PFK, GDH, AcPase, TIM, PGK, PTM, enolase and fumarase were normal or showed modifications of no statistical significance.

The percentage of reticulocytes in our patients ranged from 2 to 30 %. The correlation coefficient between enzymatic activities and reticulocytes showed no statistical significance for almost all the enzymatic activities studied, both in thalassaemia and in thalassodrepanocytosis, with exception of GOT which in thalassodrepanocytosis only showed a statistical significant correlation ($P < 0.05$).

A quantitative comparison of the various enzymatic activities of normal red cells (significant from a metabolic point of view since all the enzymatic activities have been expressed in μ moles of

Table I

Erythrocyte enzymatic activities in normal subjects and in patients with thalassaemia and thalassaodrepanocytosis (μ moles of substrate/1 min/1 ml of haemolysate)

Enzyme	Type of erythrocytes						
	Normal	Thalassaemia		p ⁰⁰	Thalassaodrepanocytosis		
	Enzymatic activity ^a	Enzymatic activity ^a	per cent variation ⁰⁰		Enzymatic activity ^a	per cent variation	p ⁰⁰⁰
HK	0.0106 (14)	0.0911 (14)	+193	<0.05	0.0183 (7)	+ 74	=0.05
PHI	2.133 (22)	3.966 (23)	+ 86	<0.01	3.966 (18)	+ 86	<0.001
PFK	0.099 (13)	0.093 (16)	- 6	>0.50	0.098 (8)	- 1	>0.50
Ald.	0.090 (13)	0.123 (13)	+ 37	<0.05	0.124 (11)	+ 38	<0.001
TIM	29.005 (14)	45.930 (17)	+ 58	<0.05	27.650 (8)	- 4.5	>0.50
GAPDH	0.440 (14)	0.894 (18)	+103	<0.001	0.742 (8)	+ 68	<0.01
PGK	3.092 (13)	4.316 (17)	+ 40	<0.001	2.940 (8)	- 5	>0.50
PTM	0.108 (13)	0.238 (20)	+125	<0.05	0.149 (9)	+ 42	>0.10
Enol.	0.099 (14)	0.171 (16)	+ 73	=0.001	0.107 (8)	+ 7	>0.50
PK	0.095 (20)	0.171 (23)	+ 80	<0.001	0.192 (18)	+102	<0.01
LDH	2.024 (14)	2.526 (14)	+ 25	<0.001	2.680 (11)	+ 32	<0.01
GDH	0.0064 (13)	0.0068 (18)	+ 6	>0.50	0.0109 (8)	+ 70	<0.05
Fum.	0.864 (13)	1.456 (17)	+ 69	<0.01	0.968 (10)	+ 12	<0.60
MDH	2.380 (22)	3.051 (10)	+ 28	<0.02	2.940 (12)	+ 24	<0.05
G6PDH	0.068 (19)	0.116 (15)	+ 70	<0.01	0.093 (14)	+ 36	<0.01
6PGDH	0.073 (20)	0.121 (28)	+ 66	<0.001	0.091 (19)	+ 24	<0.05
GOT	0.017 (18)	0.039 (22)	+135	<0.001	0.075 (16)	+201	<0.001
GPT	0.0046 (18)	0.0077 (22)	+ 66	<0.05	0.0082 (16)	+ 77	<0.05
Arg	0.139 (15)	0.208 (15)	+ 50	<0.001	0.194 (12)	+ 21	<0.05
AcPase	0.013 (22)	0.0164 (23)	+ 6	>0.50	0.0166 (18)	+ 8	>0.05

^a Mean values

⁰⁰ Variation in respect to normal

⁰⁰⁰ Level of statistical significance of the variation in respect to normal.

In brackets the number of subjects examined

Abbreviations see page 530

substrate transformed in the time unit) shows a decrease in the following order TIM > PGK > MDH > PHI > LDH > Fum. > GAPDH > Arg > PTM > PFK = Enol. > PK > Ald. > 6PGDH > G6PDH > GOT > AcPase > HK > GDH > GPT

In thalassaemic red cells this quantitative relationship is changed and shows the following order TIM > PGK > PHI > MDH > LDH > Fum. > GAPDH > Arg > PTM > PK = Enol. > Ald. > 6PGDH > G6PDH > PFK > GOT > HK > AcPase > GPT > GDH

In patients with thalassaodrepanocytosis there is the following order TIM > PHI > PGK = MDH > LDH > Fum. >

GAPDH > Arg > PK > PTM > Ald. > Enol. > PFK >
G6PDH > 6GPDH > GOT > HK > AcPase > GDH > GPT

Discussion

Our results indicate that in thalassaemia and thalassodrepanocytosis there is an increase of various erythrocyte enzymes. This increase concerns a greater number of enzymes in thalassaemia than in thalassodrepanocytosis, and is of different degree for the different enzymes. It does not seem to be limited to enzymes regulating particular metabolic cycles, since it concerns enzymatic systems belonging to different metabolic pathways. To explain the significance of these enzymatic increases it is necessary to answer the question as to whether they constitute a characteristic of the thalassaemic erythrocytes, or whether they depend rather on the high percentage of young erythrocytes existing in the thalassaemic syndromes. It is, in fact, noted that the young erythrocytes, and in particular the reticulocytes, show in respect to the mature red cells, an increase in many enzymatic activities (41-49)

In an attempt to solve this question we have studied the coefficient of correlation between enzymatic activities and the percentage of reticulocytes. This coefficient was seen to be no significant for almost all the enzymatic activities examined, except for GOT in patients with thalassodrepanocytosis, thus indicating that the enzymatic increase present in thalassaemic erythrocytes cannot be considered entirely dependent of the high reticulocytosis existing in these diseases.

However it must be considered that the study of the correlation between enzymatic activities and reticulocytosis does not solve the problem in an absolute sense, since an increase in enzymatic activities may also be determined by a high percentage of still young erythrocytes which have already gone through the reticulocyte phase and thus seem as non reticulated, a haematologic situation that may exist in certain patients at the moment of the investigation.

An other problem arising from the increased percentage of young erythrocytes in the thalassaemic syndromes concerns the enzymatic activities showing a normal level. Since these activities are increased in normal young erythrocytes, they should also be in

thalassaemic erythrocytes, which comprise a fair percentage of young elements. Considering that such enzymatic activities should normally be related to the immaturity of the erythrocytes, their apparently normal level in thalassaemia could correspond in fact to a diminished activity. If there existed in thalassaemia an enzymatic deficiency capable of shortening the life of erythrocytes and thus determining pathological haemolysis, there would follow a greater number of young erythrocytes in circulation, and thus could compensate and hide a possible enzymatic deficiency. These considerations obviously have significance only as a work hypothesis, and will be verified by further research in this Institute.

The enzymatic determinations were carried out on haemolysates prepared with a standard volume of erythrocytes, instead of a standard number of them, and thus the enzymatic activity was referred to an constant mass of erythrocytes, independent of the variation in volume of the erythrocytes. If the activity is referred to a determined number of cells, the variations in the volume of erythrocytes determine a parallel modification of the cellular mass studied, and thus influence the results. This is of particular importance for the present research, as in thalassaemia the red cell volume is decreased (microcytosis).

By quantitative comparison a marked difference between the various enzymatic activities can be seen. This comparison is significant from a metabolic point of view since all enzymatic activities have been expressed in μ moles of substrate transformed in the time unit. Considering the various enzymatic activities according to their role in the various metabolic pathways, some observation can be made, particularly concerning the enzymes of glycolysis. In normal erythrocytes the lowest values among the enzymatic activities of glycolysis have been shown for aldolase and above all for HK, which must then be considered a limiting factor of glycolysis in the erythrocytes. In thalassaemia and thalasmodrepanocytosis there are some modifications in the quantitative relationship of the various enzymatic activities of glycolysis: the one presenting the lowest values, and therefore becoming a limiting factor was HK, followed by PFK.

It can be concluded that in thalassaemia and thalasmodrepanocytosis there exists in erythrocytes an increase of many enzymatic activities with normal values in others. With regard to the possible relationship between enzymatic alteration and increased haemolysis

it would seem that particular significance can be attributed to the enzymes showing a normal level. As thalassaemic erythrocytes are composed of relatively young cells showing normally a high level of enzymatic activities, the apparently normal values in thalassaemia could really be considered diminished. However obvious and definite enzymatic alterations to which the increased haemolysis in thalassaemia and thalassodrepanocytosis could be attributed, have not been seen during our research.

Sommaire

All the enzymatic activities of glycolysis, some of the oxidative shunt (glucose-6-phosphatase and 6-phosphogluconate dehydrogenase) and of other metabolic pathways (glyceric phosphate dehydrogenase, glutamic-oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase, arginase and acid phosphatase) were studied in the erythrocytes of normal subjects and of patients with thalassaemia or thalassodrepanocytosis. In thalassaemia there was an increase of almost all the enzymatic activities, except for phosphofructokinase, glyceric phosphate dehydrogenase and acid phosphatase. In thalassodrepanocytosis the increase concerned a minor number of enzymes, namely hexokinase, phosphohexoseisomerase, aldolase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, pyruvic kinase, lactic acid-glucose-6-phosphate-6-phosphogluconate- and malic-dehydrogenases, glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminases and arginase. These increases were not correlated with the reticulocytosis. Among the enzymes of glycolysis those of the lowest values and thus bearing a significance as limiting factors, are hexokinase and aldolase in normal erythrocytes and hexokinase and phosphofructokinase in thalassaemic erythrocytes. The possibility has been put forward that in the thalassaemic syndromes the enzymatic activities appearing to be normal should in fact be considered as diminished, the diminution being masked by the presence of young erythrocytes, which notoriously have an increased enzymatic activity.

Résumé

Dans les érythrocytes d'individus sains et de malades atteints de thalassémie et de thalassodrépanocytose, nous avons étudié les enzymes de la glycolyse, du shunt oxydant et de quelques autres processus du métabolisme. Dans la thalassémie, nous avons trouvé une augmentation de presque tous les enzymes à l'exception de la phosphofructokinase, de la glycérphosphate-déshydrogénase et de la phosphatase acide. Dans la thalassodrépanocytose, cette augmentation touche un moindre nombre d'enzymes, à savoir l'hexokinase, la phosphohexose-isoenzyme, l'aldolase, la glycéroaldéhydephosphate-déshydrogénase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la 6-phosphogluconate-déshydrogénase, la malate-déshydrogénase, les transaminases glutamiques oxalo-acétique et pyruvique, ainsi que l'arginase. Ces augmentations n'étaient pas en relation avec la réticulocytose. Parmi les enzymes de la glycolyse qui ont les valeurs les plus basses et par là une importance en tant que facteurs limitatifs, se trouvent dans les érythrocytes normaux l'hexokinase et la aldolase, dans les érythrocytes thalassémiques l'hexokinase et la phosphofructose-kinase. La possibilité est mise en avant que les activités enzymatiques apparemment normales dans les syndromes de thalassémie doivent être considérées comme étant diminuées, cette diminution n'étant pas manifeste vu la présence d'érythrocytes jeunes.

Zusammenfassung

In Erythrocyten von Gesunden und von Patienten mit Thalasämie und Thalasmodrepanocytose wurden die Enzyme der Glykolyse, einige des oxydativen Stroms (Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-dehydrogenase) und anderer Stoffwechselprozesse (Glycero-phosphat-dehydrogenase, Glutamin-Oxaloacetat- und Glutamin-Pyruvat-Transaminasen, Arginase und saure Phosphatase) untersucht. Bei der Thalasämie fand sich eine Zunahme der Aktivität fast aller Enzyme, mit Ausnahme der Phosphofruktokinase, der Glycero-phosphat-dehydrogenase und der sauren Phosphatase. Bei der Thalasmodrepanocytose betraf diese Zunahme eine kleinere Zahl von Enzymen, nämlich der Hexokinase, der Phosphohexoisomerase, der Aldolase, der Glyceraldehyd-phosphat-dehydrogenase, der Pyruvatkinase, der Milchsäure-Glucose-6-phosphat-, 6-Phosphogluconat- und Malonate-dehydrogenasen, sowie der Glutamin-Oxaloacetat- und der Glutamin-Pyruvat-Transaminasen und der Arginase. Diese Zunahmen scheinen nicht in Beziehung zur Retikulozytose. Unter den Enzymen der Glykolyse weisen in normalen Erythrocyten die Hexokinase und die Aldolase bei der Thalasämie die Hexokinase und die Phosphofruktokinase die niedrigsten Werte auf und dürften damit als limitierende Faktoren von Bedeutung sein. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß bei dem Thalasämie-Syndromen die scheinbar normalen Enzymaktivitäten in Wirklichkeit als vermindert zu betrachten sind, wobei diese Verminderung zufolge der Gegenwart jugendlicher Erythrocyten nicht zur Geltung kommt.

References

1. CASON, E. FLAHOUGH, C. L.; ICHER, C. E. AND ALVINO, A. S. Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes. *Science* **124** 484 (1956)
2. WALLER, H. D. LOEBER, G. W. AND TABATABAI, M. Hemolyse und Fehlen von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase in roten Blutzellen (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten). *Klin. Wochs.* **35** 1022 (1957)
3. SCHWENK, A.; SEIBER, Ch. AND ADAM, A. Enzymatic abnormality in erythrocytes of population sensitive to vicia faba or drug induced hemolytic anemia. *Nature*, **171** 1265, 1953.
4. LANTIER, P.; BERNETTI, P.; GERMANO, F. & VENTURA, S. La individualità biochimica dell'eritrocita fabico. Sopra alcune anomalie biochimiche ed enzimatiche delle eritrociti nei pazienti affetti da favismo nei loro familiari. *Haematologica* **43** 205 (1958)
5. SAMPOUR, G. & STONE, G. I. Nuovi aspetti dell'alterato biochimismo degli eritrociti di favici anemia prima che completa della glucosio-6-fosfatodeidrogenasi. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* **35** 327 (1959)
6. ZUCKERMAN, W. H.; LEUBARD, R. E. AND CHILDS, B. A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **102**: 169 (1958)
7. SHAMROV, N. T. AND DIAMOND, L. K. Enzyme deficiency in erythrocytes in congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Pediatrics* **24** 243 (1959)
8. TAMAKI, K. R. VALENTINO, W. N. AND MIWA, H. I. Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* **14** 267 (1962)
9. BERNETTI, P. GERMANO, F. AND ZUCKERMAN, W. H. The behavior of the erythrocyte pyrophosphatase activity in the enzyme-deficiency hemolytic anemia. II A new test for the detection of enzyme defect. *Acta haemat. (Basel)* **27** 246 (1962).
10. FRANKED, T. A. J. The nature of the erythrocyte defect and the hemolytic mechanism in hereditary spherocytic and hereditary nonspherocytic hemolytic

- anemia. Freiburger Symp. über Hämolyse und hämolytische Erkrankungen 1959 (Springer Berlin/Heidelberg/New York 1961)
11. LORER, G. W. Nichtsphaerocytaire hämolytische Anämien. Erbliche Stoffwechsel-Krankheiten. (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1962)
 12. LORER, G. W. WALLER, H. D.; KARGER, O.; SCHLEGEL, B. UND MÜLLER, A. Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. Klin. Wochr. 36. 1008 (1958)
 13. LORER, G. W. UND WALLER, H. D. Zur Biochemie der Erythrocyten-Alterung. Folia Haemat. (Lpz.) 78. 385 (1961)
 14. SARKIS, J. C.: Erythrocyte cholinesterase titers in hematologic disease states. Amer. J. Med. 27. III (1959)
 15. CORREI, F. MAFREI, G. PUNTORE, P. CAOCCHI, E. Proteine, Eptidi alcuni enzimi del globulo rosso della sua frazione stromatica in vari casi di emopatie infantili. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 35. 1014 (1959)
 16. MANUANELLI, G. & SAPONARO V.: La latticodeidrogenasi eritrocitaria nella emopatia mediterranea. Bioch. Appl. 6. 388 (1959)
 17. SAM, M. D. AND SPEAR, P. W. Red Cell transaminase levels in anemia. II Thalassemia minor. J. Lab. Clin. Med. 58. 580 (1961).
 18. REYNOLDS, J. FOLLETTE, J. H. AND VALENTINE, W. N.: The arginase activity of erythrocytes and leukocytes with particular reference to pernicious anemia and thalassemia major. J. Lab. Clin. Med. 50. 78 (1957)
 19. GRIGORI, F. LORER, G. W. BRUNETTI, P. ET WALLER, H. D. Le métabolisme énergétique de l'érythrocyte thalassémique. Acta Haemat. 28. 293 (1962)
 20. TROFANO, L.; DE STEFANO, S. BELFIORE, F. Attività transaminasica G.O. G.P. aldolasi latticodeidrogenasi negli eritrociti di soggetti normali ed emopatici. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 36. 1319 (1960).
 21. BELFIORE, F. L'attività aldolasi degli eritrociti nella talassemia nella talassemiodrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 36. 511 (1962)
 22. BELFIORE, F.: L'attività latticodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassemiodrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 36. 514 (1962)
 23. TROFANO, L. BELFIORE, F. Alcune attività enzimatiche negli eritrociti di ammalati portatori di talassemia di talassemiodrepanocitosi. Haematol. Latine 5. 285 (1962)
 24. CHAPMAN R. G. HENDERSON M. A. WALTERSDORF, A. M.; HENDERSON, F. M. AND GARRIS, B. W. Erythrocyte metabolism. V Level of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis. J. clin. Invest. 41. 1249 (1962)
 25. BAUD, F. H. UND HENDERSON, K. Bestimmung und Eigenschaften der Phosphohexoseisomerase des Serums. Biochem. Z. 325. 332 (1953/54).
 26. LONG, K. STARK, W. L. AND LARDY, H. Phosphoenolpyruvate kinase; in COLOWICK'S AND KAPLAN'S Methods in Enzymology Vol. 1 p. 307 (New York Academic Press, 1955)
 27. BAUD, F. H.: Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase. Biochem. Z. 325. 156 (1954)
 28. MEYER-ROSENTHAL E.; BERNSTEIN, S. UND BOCHER, T. Isolierung der Triphosphat-isomerase. Naturwissenschaften 40. 59 (1953)
 29. VILK, S. F. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from muscle; in COLOWICK'S AND KAPLAN'S Method in Enzymology Vol. 1 p. 401 (New York Academic Press, 1955).
 30. BOCHER, T. Phosphoglycerate-kinase from Brewer's yeast; in COLOWICK'S AND KAPLAN'S Methods in Enzymology Vol. 1 p. 415 (New York Academic Press, 1955)
 31. BOCHER, T. AND FLEISHER, G.: Pyruvate kinase from muscle in COLOWICK'S AND KAPLAN'S Methods in Enzymology Vol. 1 p. 435 (New York Academic Press, 1955).

12. WIESELEWITZ, F AND LA DUE, J S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. exp. Biol. N Y* 90 210 (1955)
13. SCHMIDT E. SCHMIDT F W UND WILDMANN E. Vergleichende Aktivität. Bestimmung von Enzymen des Energieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen und in der Ratte Leber. *Klin. Wschr.* 36. 172 (1958)
14. RACER, S.: Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 4 211 (1950)
15. Nochenius Boehringer 1961
16. MARX, P A. Red cell glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenase and nucleoside phosphorylase. *Science* 127 1338 (1958)
17. KARMY, A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *J. clin. Invest.* 34 151 (1955)
18. WIESELEWITZ, F AND LA DUE, J S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic diseases. *Proc. Soc. exp. Biol. N Y* 91 569 (1956)
19. TOSCANO, L. & BELFIORE, F. L. attività arginasi nel siero di sangue di epistapedi. *Progr. Med. (Napoli)* 18. 7 (1962)
20. ARONSON, M. A. AND SZCZYPKOWSKI, A. J. Use of p-nitrophenylphosphate as substrate in determination of serum phosphatase. *Amer. J. clin. Path.* 47 571 (1947).
21. RECHTWEISER, D.; OTTOLENGHI, P AND DEWITTE O F. The metabolism of erythrocyte. XIII. Enzyme activity in the reticulocyte. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 34 222 (1956)
22. MARX, P A. JOSEPH, A. B.; HIRSCHBERG, E. AND BAKER, J. Studies on the aging of human red blood cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75. 95 (1958).
23. RAVENHILL S. Reifung und Alterungsvorgänge in Erythrocyten. *Folia Haemat. (Lps.)* 28- 964 (1961)
24. BELFIORE, F. Attività malicodidrogenasica nel reticolociti nel normociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 39 745 (1963)
25. BELFIORE, F. Attività transaminasica glutammico-ossalacetico (GOT) glutammico-piruvico (GPT) ed attività arginasi nel reticolociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 39- 749 (1963).
26. BELFIORE, F & MELDOLANI, J. Attività glucoso-6-fosfatodidrogenasica, fosfoenolacetatidrogenasica, alcolica, latticodidrogenasica nel reticolociti nel normociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 39 754 (1963)
27. BELFIORE, F MELDOLANI, J. Attività piruvatochinasi, 6-fosfogluconatodidrogenasica ed ATPasi del reticolociti del normociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 39- 1574 (1963).
28. BELFIORE, F; CALGARA, G. BONAVENTURA, S.: Attività isocitricodidrogenasica del reticolociti del normociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 39- 1577 (1963)
29. BELFIORE, F MELDOLANI, J CALGARA, G. Attività esochinasi, fosofructofoschinasi, gliceraldeidofosfatodidrogenasica fosfogliceratochinasi nel reticolociti. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 40: 1034 (1964)

Author's address: Drs. F. Belfiore, J. Meldolani and G. Calgara, Inst. of Medical Pathology University of Catania, Catania (Italy).

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik Zürich (Direktor: Prof. R. HÄGG)

Hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation

A. GANZONI UND F. RHOMBERG

Der Mangel oder selten das völlige Fehlen (15 11) an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD) der Erythrozyten – bei gewissen Rassen und Völkern beim männlichen Geschlecht weit verbreitet (1) – äußert sich in akuten hämolytischen Krisen bei latenter kompensierter Hämolyse (4) unter dem Einfluß meist therapeutisch verabreichter chemischer Stoffe (Primaquine, Nitrofurantoin u. a.) sowie nach Genuß der Saubohne (*Vicia faba*) (Übernacht bei 17). Selten sind chronische hämolytische Anämien ohne Einwirkung von Fremdstoffen (2 11 22). Der Fermenteffekt wird an das X-Chromosom gebunden mit mäßiger Penetranz vererbt. Heterozygote Trägerinnen sind klinisch gewöhnlich gesund. Die G-6-PD zeigt mehrere genetische Varianten (24 3 16). Der Enzymdefekt ist bei verschiedenen Populationen uneinheitlicher Natur (2, 20). Bei amerikanischen Negern verläuft das Krankheitsbild milder als bei Europäern. Die biochemischen Grundlagen des Erythrozytenunterganges, soweit sie abgeklärt sind, scheinen aber prinzipiell immer die gleichen zu sein. Es wurde gezeigt, daß nicht stets ein Mangel an G-6-PD vorhanden ist, sondern das Fehlen eines stroma-gebundenen Fermentaktivators nachgewiesen (26). Andererseits ist auch ein Inhibitor des Fermentes bekannt (8).

Kürzlich beobachteten wir einen jungen Italiener mit schwerer Hämolyse, welcher neben den Symptomen der subakuten Bleivergiftung einen ausgesprochenen Mangel an G-6-PD aufwies. In der Literatur sind wir dieser Kombination nicht begegnet. Der Krankheitsverlauf sei in der Folge kurz geschildert, der mögliche Zusammenhang zwischen den pathogenetischen Faktoren, Blei und Fermentdefizit, in bezug auf die Hämolyse diskutiert.

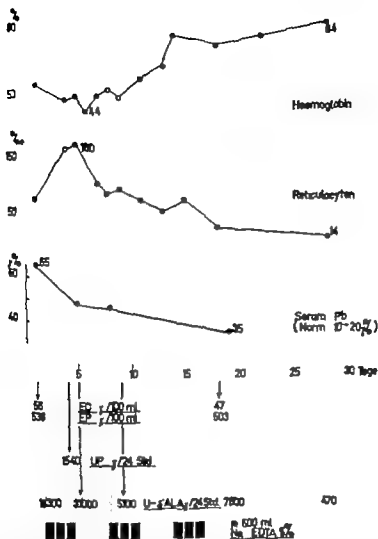


Abb. 1 Verlauf der Erkrankung. EC = Erythrocytapheresis, EP = Erythrocytoporphyrin, UP = Uroporphyrin, UA-ALA = Urin- δ -Aminolävulinat.

Kasuistik (F. Seibert, 1936, *Schweizerische Rundschau* 435/63, Med. Pol.) Erstliche Erscheinungen in der Vorgeschichte fehlen. Episoden von Anämie oder Gelbsucht werden verneint. Seit Anfangs Oktober 1963 ist der Patient mit Retikulozytopenie von Akkumulatoren beschäftigt. Mitte November 6 Wochen später treten kolikartige, abdominale Schmerzen auf gleichzeitig bestehen Obstipation, große Nervosität, Schlaflosigkeit. Eine weitere Woche danach, am 22. November 1963, erfolgt die Hospitalisation auf der Medizinischen Universitätsklinik Zürich.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Zürich (Direktor: Prof. R. HROUZ)

Hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation

A. GANZONI UND F. RHOMBERG

Der Mangel oder selten das völlige Fehlen (15 11) an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD) der Erythrozyten – bei gewissen Rassen und Völkern beim männlichen Geschlecht weit verbreitet (1) – äußert sich in akuten hämolytischen Krisen bei latenter kompensierter Hämolyse (4) unter dem Einfluß meist therapeutisch verabreichter chemischer Stoffe (Primaquine, Nitrofurantoin u. a.) sowie nach Genuß der Saubohne (*Vicia faba*) (Übernacht bei 17). Selten sind chronische hämolytische Anämien ohne Einwirkung von Fremdstoffen (2 11 22). Der Fermenteffekt wird an das X-Chromosom gebunden mit mäßiger Penetranz vererbt. Heterozygote Trägerinnen sind klinisch gewöhnlich gesund. Die G-6-PD zeigt mehrere genetische Varianten (24 3 16). Der Enzymdefekt ist bei verschiedenen Populationen unehheitlicher Natur (2, 20). Bei amerikanischen Negeren verläuft das Krankheitsbild milder als bei Europäern. Die biochemischen Grundlagen des Erythrozytenunterganges, soweit sie abgeklärt sind, scheinen aber prinzipiell immer die gleichen zu sein. Es wurde gezeigt, daß nicht stets ein Mangel an G-6-PD vorhanden ist, sondern das Fehlen eines stromagebundenen Fermentaktivators nachgewiesen (26). Andererseits ist auch ein Inhibitor des Fermentes bekannt (8).

Kürzlich beobachteten wir einen jungen Italiener mit schwerer Hämolyse, welcher neben den Symptomen der subakuten Bleivergiftung einen ausgesprochenen Mangel an G-6-PD aufwies. In der Literatur sind wir dieser Kombination nicht begegnet. Der Krankheitsverlauf sei in der Folge kurz geschildert, der mögliche Zusammenhang zwischen den pathogenetischen Faktoren, Blei und Fermentdefekt, in bezug auf die Hämolyse diskutiert.

Der Hämolyse scheint die direkte Wirkung des Metalls auf den Erythrozyten zugrunde zu liegen. Mögliche Angriffspunkte des Blei werden weiter unten diskutiert. Sicher erfolgt eine Elektrolytstörung in Form zellulären Kaliumverlustes (14).

Die fehlende Kompensation der leichten Hämolyse und der hypochrome Charakter der Anämie schließen auf die zusätzliche Störung der Erythropoese. Durch markiertes Glycin wurde neuerdings die Hemmung der Globinsynthese unter Bleiwirkung gezeigt (14). Bekannt ist die Störung der Hämsynthese. Geschert sind die Blockierung der Umwandlung der δ -Aminolävulinsäure (δ -ALA) in Porphobilinogen über Hemmung der δ -ALA Dehydrase sowie die Hemmung des Einbaus des Eisenmoleküls in den Protoporphyrinring durch Inaktivierung der Hämsynthetase. Beide Fermente enthalten funktionell bedeutungsvolle SH-Gruppen, die offenbar durch Blei inaktiviert werden (9, 21). Die erhöhte Urinausscheidung der δ -ALA sowie die Anhäufung von Protoporphyrin intraerythrozytär bilden die bekannten, chemisch faßbaren Korrelate dieser beiden Störungen.

Die regelmäßig vermehrte Coproporphyrinausscheidung im Urin und die Anhäufung dieses Porphyrins in den roten Blutzellen lassen die Hemmung der Umwandlung von Copro- in Protoporphyrinogen vermuten. Gegen diese Annahme sprechen das Fehlen essentieller Sulfhydrylgruppen im verantwortlichen Enzym sowie der dommerende Gehalt an erythrozytärem Protoporphyrin. Die vermehrte Coproporphyrinausscheidung läßt sich durch die nachgewiesene Synthese von Coproporphyrin aus δ -ALA in der Niere erklären (27). Die Erhöhung des Erythrozyten coproporphyrins als Rückkureffekt hinter dem angehäuften Protoporphyrin.

Unbewiesen ist die ebenfalls postulierte Hemmung der δ -ALA Bildung aus aktivierter Bernsteinsäure und Glykokoil (9).

Die Störung der Hämsynthese macht den hypochromen Charakter der Anämie verständlich. Eisen tritt wohl in die Erythroblasten und Retikulozyten ein, wird aber in inaktiver Form eingelagert. Mit der Berlinerblaufärbung lassen sich vermehrt Sideroblasten und Siderozyten nachweisen.

2. *Die Anämie bei G-6-PD-Mangel* (Übersichten bei 14, 17)
Die G-6-PD ist das erste Enzym in der Reaktionskette des Pentosephosphatzyklus (PP Zyklus). Das entstehende 6-Phosphat-Glukonat wird in einem zweiten Schritt zu 3-Keto-6-Phosphat-Glukonat

dehydriert. Beide Reaktionen liefern aus $\text{NADP}^+ \text{NADPH}_2$. Letzteres überträgt unter der Wirkung der Glutathionreduktase Wasserstoff auf oxydiertes Glutathion (GSSG) und liefert reduziertes Glutathion (GSH)

Bei Mangel an G-6-PD ist auf Grund der quantitativ ungenügenden Einschleusung von Glukose-6-Phosphat in den PP Zyklus der GSH-Gehalt der Erythrozyten vermindert. Genügende GSH Konzentration hat für den Erythrozyten vitale Bedeutung. Membran- und Enzym-Sulphydrylgruppen werden durch GSH stabilisiert u. a. ist auch die Aktivität der G-6-PD vom reduzierten Glutathion abhängig (25). GSH dient als Wasserstoffdonator der Glutathionperoxydase, welche unter der Einwirkung von Oxydantien entstehenden Wasserstoffsuperoxyd in Wasser umgewandelt (25).

Hier liegt zum mindesten einer der Angriffspunkte der hämolyseauslösenden Stoffe beim erblichen G-6-PD-Mangel. Primaquine, Nitrofurantoin, Phenylhydrazin u. a. bewirken die Bildung von H_2O_2 im Erythrozyten (10) massiven Abfall des zellulären GSH (18, 25, 28) mit gleichzeitigem Anstieg des GSSG. Eine Hypothese des Wesens der nun eintretenden akuten Hämolyse beruht auf der Annahme von Reaktionen zwischen GSSG mit Thiolgruppen verschiedener «SH Enzyme» (G-6-PD) und Membranstrukturen, was den Untergang der Zelle zur Folge haben soll.

Andere Autoren stellen den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der Erythrozyten als Ursache des beschleunigten Zellunterganges in den Vordergrund. Unter der Einwirkung von Primaquine, Furadantin und anderen Oxydantien, auch der Vicia fava, sinkt neben dem NADPH_2 auch der NADH_2 -Gehalt der roten Blutzellen. Die Stabilisierung des reduzierten Glutathions erfolgt tatsächlich nicht ausschließlich unter Vermittlung der Codehydrase II welche der PP Zyklus liefert, sondern durch eine NADH_2 -abhängige zweite Glutathionreduktase, die mit dem glykolytischen Abbau (Embden-Meyerhof Weg) der Glukose in Verbindung steht. Unter oxydativem Stress – bei bestehendem G-6-PD-Defizit – wird auch dieses System insuffizient und ist nicht imstande, die notwendige GSH Konzentration aufrecht zu erhalten (25).

NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid = DPN = Codehydrase I

NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat = TPN = Codehydrase II

Die Erschöpfung der Reserven an Codehydrase I hat zudem die Verlangsamung der Glykolyse zur Folge. Pyruvat wird nicht mehr in genügendem Umfange zu Milchsäure reduziert, der Gehalt an Brenztraubensäure und ihrer unmittelbaren Vorläufer nimmt zu, damit leidet die Substratkettenphosphorylierung, die Konzentration von ATP sinkt, diejenige von ADP steigt an (18, 22).

Der Mangel an energiereichem Phosphat – wie er auch dem alten Erythrozyten eigen ist – wird zum Teil als ausreichend für den Eintritt der Hämolyse angesehen (18). Wahrscheinlich ist der Mechanismus wesentlich komplexer (2, 5, 22, 28). Strukturelle Schäden der kompliziert gebauten Erythrozytenmembran, z. B. durch Reaktion mit GSSG, der damit eintretende intrazelluläre Kaliumverlust und das Versagen der ATP abhängigen Ionenpumpe dürften den tatsächlichen pathogenetischen Vorgängen des vorzeitigen Zellunterganges näher kommen. Zu erwähnen ist die Abnahme des zellulären Lipidgehaltes, der ebenfalls mit der Hämolyse in Verbindung gebracht wird (2).

Schließlich erfahren weitere Fermente eine Erniedrigung (Hexokinase, Pyrophosphatase) wobei wiederum die präzisen pathogenetischen Vorgänge der Abklärung bedürfen (5, 25).

Die biochemischen und hämatologischen Konsequenzen bei G-6-PD-Mangel sind denjenigen sehr nahe stehend, wie sie bei hereditärem Mangel an GSH (23) oder Glutathionreduktase (7, 19) eintreten.

3 Zusammenhang zwischen G-6-PD-Mangel und Bleivergiftung. Die schwere Hämolyse unseres Patienten ist durch alleinige Einwirkung des Metalls schwer erklärbar. Die Bleiwerte im Serum und die Ausscheidung der δ -ALA im Urin lassen nicht mehr als eine mittel schwere Bleiintoxikation annehmen. Außerdem sind derartige hämolytische Krisen bei Bleivergiftung eine Rarität. Es stellt sich damit die Frage des Zusammenhanges zwischen den beiden Syndromen.

Bekannt ist die Affinität des Bleis, wie anderer Schwermetalle, zu den SH-Gruppen von Enzymen und anderen Proteinen (9). Auch die G-6-PD enthält essentielle Sulfhydrylgruppen. Die Aktivität dieses Enzyms wurde bei unserem Patienten nur während der akuten Krankheitsphase bestimmt und zeigte eine Erniedrigung auf 6% der Norm. Grundsätzlich wäre damit ein etwacher Favismus zu diskutieren, die ausschließlich durch die Einwirkung

des Schwermetalls bedingte Fermentverminderung. Diese Annahme ist wenig wahrscheinlich. Hämolytische Krisen bei Bleivergiftung sollten in diesem Falle viel häufiger zur Beobachtung gelangen, und wohl auch unter der Wirkung anderer Schwermetalle, z. B. Quecksilber auftreten. Kürzlich beobachteten wir zwei Fälle von Bleintoxikation, die auf der Höhe der Erkrankung normale Aktivitäten der G-6-PD aufwiesen. Wir sind berechtigt, bei unserem Patienten den genetisch bedingten Enzymdefekt anzunehmen.

Blei greift sicher nicht als Oxydans in den Zellstoffwechsel ein, wie das für die üblicherweise hämolyseauslösenden Substanzen beim Favismus gilt und führt damit wohl kaum zur Bildung von Wasserstoffsuperoxid. Es scheint naheliegender die direkte Wirkung auf Thiolgruppen der Erythrozytenmembran (14-29) sowie, auf gleichem Wege, die unmittelbare Inaktivierung von GSH zu vermuten. In der Folge führen dieselben Vorgänge wie bei der drogeninduzierten Hämolyse zum Zelluntergang. Leider wurde die Bestimmung des reduzierten Glutathions bei unserem Patienten unterlassen.

Der Krankheitsverlauf unseres Patienten gleicht demjenigen des typischen Favismus. Die nach ca. 1 Woche einsetzende ausgeprägte Regeneration, einhergehend mit Retikulozytose bis 180% ist charakteristisch. Die junge Zellpopulation, ausgestattet mit einem leistungsfähigen Fermentmuster auch höheren Gehalt an G-6-PD ist der Einwirkung der Noxe gewachsen. Bei hämolytischer Bleianämie haben wir allerdings ebenfalls rasche Erholung gesehen. Die Wirkung der EDTA Infusionen, zur prompten Senkung der Bluthlerwerte führend, ist möglicherweise an der raschen Korrektur des Krankheitsbildes mitbeteiligt.

Zusammenfassung

Die Beobachtung eines Patienten mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel, bei welchem im Zusammenhang mit einer mittelschweren Bleintoxikation eine akute hämolytische Krise ausbricht, veranlaßt die Gegenüberstellung dieser beiden pathogenetischen Faktoren für die Anämie. Die hämatologischen Veränderungen durch Blei-Hämolyse, Störung der Globin- und Häm synthese – sowie diejenigen durch Mangel an G-6-PD erfahren ihre Darstellung. Es wird angenommen, daß Blei nicht als Oxydans in den Erythrozytenstoffwechsel eingreift, wie dies beim typischen Favismus der Fall ist, sondern die direkte Blockierung essentieller Sulfhydrylgruppen eintritt. Der Mechanismus des Zellunterganges beschreibt dann dieselben Wege wie bei der drogeninduzierten Hämolyse. Die biochemischen Grundlagen der beschleunigten Zerstörung der roten Blutkörperchen werden diskutiert.

Summary

The observation of an acute haemolytic crisis associated with moderate degree of lead poisoning in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency provides the occasion for comparison of these pathogenetic factors for anaemia. The haematological changes brought about by lead poisoning—haemolysis, disturbance of globin and haem synthesis—and by G-6-PD deficiency are described. It is assumed that lead poisoning does not act as an oxidant on the erythrocyte metabolism as is the case in typical fa. lem., but by the direct blocking of essential sulphhydryl groups. The process of cell destruction follows the same course as with drug-induced haemolysis. The biochemical basis of the accelerated destruction of the red cells is discussed.

Résumé

L'observation d'un malade atteint d'un manque en glucose-6-déshydrogénase et des lequel une crise hémolytique survint à la suite d'une intoxication plomb d'un degré moyen, incita à la confrontation du rôle que ces deux facteurs ont joué dans la pathogénie de l'anémie. Les altérations hématologiques causées par le plomb — hémolyse, perturbation de la synthèse de la globine et de l'hème — ainsi que celle causée par le manque de G-6-PD sont décrites. Il semble que le plomb intervienne pas dans le métabolisme des érythrocytes en tant qu'agent oxydant, comme c'est le cas dans le ferdeux typique, mais que les groupes sulfhydryles soient directement bloqués. La destruction des cellules se fait de la même façon que dans les hémolyse médicamenteuses. Les mécanismes biochimiques fondamentaux de la destruction accélérée des érythrocytes sont discutés.

Literatur

- BERNARD, J. NAYAN, Y. SCALON, C. ET TANGER, J. Les manifestations aiguës du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris* 115, 439 (1964).
- BERNARD, J. ET FOYER, P. L'anémie hémolytique chronique avec déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris* 115, 467 (1964).
- BOYER, S. H., PORTER, I. H. AND WEILBACHER, R. G. Electrophoretic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and its relationship to enzyme deficiency in man. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 1868 (1962).
- BEUTER, G. J., TARLOV, A. R. AND KELLERMEYER, R. W. The hemolytic effect of primaquine. XII Shortened erythrocyte life span in primaquine sensitive male negroes in the absence of drug administration. *J. Lab. clin. Med.* 48, 217 (1961).
- BEUTER, G. J.; POWELL, R. D. AND ALVINO, A. S. Studies on the mechanism of the primaquine-type hemolysis. Erythrocyte ATP-content and hexokinase activity. *J. Lab. clin. Med.* 60, 861 (1962).
- CASOY, P. E., BEUTER, G. J. AND ICLES, C. Decreased glutathione reductase with susceptibility to hemolysis. *J. Lab. clin. Med.* 59, 804 (1961).
- CASOY, P. E.; OTT, G. T.; FEMER, H.; HIRATA, I.; LOMO, W. K. AND BEUTER, G. J. Patterns of hemolytic susceptibility and metabolism. *Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon* 1963 p. 635 (Karger Basel/New York 1963).
- CASOY, P. E., SCHUBER, S. I. AND ALVINO, A. S. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes (abstract). *J. Lab. clin. Med.* 68, 794 (1959).
- CHODURA, L. J. Disturbances in the biosynthesis of haem in lead intoxication. *J. Pediat.* 64, 174 (1964).

des Schwermetalls bedingte Fermentverminderung. Diese Annahme ist wenig wahrscheinlich. Hämolytische Krisen bei Bleivergiftung sollten in diesem Falle viel häufiger zur Beobachtung gelangen, und wohl auch unter der Wirkung anderer Schwermetalle, z. B. Quecksilber auftreten. Kürzlich beobachteten wir zwei Fälle von Bleintoxikation, die auf der Höhe der Erkrankung normale Aktivitäten der G-6-PD aufwiesen. Wir sind berechtigt, bei unserem Patienten den genetisch bedingten Enzymdefekt anzunehmen.

Blei greift sicher nicht als Oxydant in den Zellstoffwechsel ein, wie das für die üblicherweise hämolysenauslösenden Substanzen beim Favismus gilt und führt damit wohl kaum zur Bildung von Wasserstoffsuperoxyd. Es scheint nahelegender die direkte Wirkung auf Thiolgruppen der Erythrozytenmembran (14-29) sowie, auf gleichem Wege, die unmittelbare Inaktivierung von GSH zu vermuten. In der Folge führen dieselben Vorgänge wie bei der drogeninduzierten Hämolyse zum Zelluntergang. Leider wurde die Bestimmung des reduzierten Glutathions bei unserem Patienten unterlassen.

Der Krankheitsverlauf unseres Patienten gleicht demjenigen des typischen Favismus. Die nach ca. 1 Woche einsetzende ausgeprägte Regeneration, einhergehend mit Retikulozytose bis 180%, ist charakteristisch. Die junge Zellpopulation, ausgestattet mit einem leistungsfähigen Fermentmuster auch höheren Gehalt an G-6-PD ist der Einwirkung der Noxe gewachsen. Bei hämolytischer Bleianämie haben wir allerdings ebenfalls rasche Erholung gesehen. Die Wirkung der EDTA Infusionen, zur prompten Senkung der Blutbleiwerte führend, ist möglicherweise an der raschen Korrektur des Krankheitsbildes mitbeteiligt.

Zusammenfassung

Die Beobachtung eines Patienten mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel, bei welchem im Zusammenhang mit einer mittelschweren Bleikontamination eine akute hämolytische Krise ausbrach, veranlaßt die Gegenüberstellung dieser beiden pathogenetischen Faktoren für die Anämie. Die hämatologischen Veränderungen durch Blei-Hämolyse, Störung der Globin- und Hämoglobinsynthese - sowie diejenigen durch Mangel an G-6-PD erfahren ihre Darstellung. Es wird angenommen, daß Blei nicht als Oxydant in den Erythrozytenstoffwechsel eingreift, wie dies beim typischen Favismus der Fall ist, sondern die direkte Blockierung essentieller Sulfhydrylgruppen eintritt. Der Mechanismus des Zellunterganges beschreitet dann dieselben Wege wie bei der drogeninduzierten Hämolyse. Die biochemischen Grundlagen der beschleunigten Zerstörung der roten Blutkörperchen werden diskutiert.

Summary

The observation of an acute haemolytic crisis associated with moderate degree of lead poisoning in patients with glucose-6-phosphat dehydrogenase (G-6-PD) deficiency provides the occasion for a comparison of these pathogenic factors for anaemia. The haematological changes brought about by lead poisoning—haemolysis, disturbance of globin and haem synthesis—and by G-6-PD deficiency are described. It is assumed that lead poisoning does not act as an oxidant on the erythrocyte membrane as is the case in typical favism, but by the direct blocking of covalent sulphhydryl groups. The process of cell destruction follows the same course as with drug-induced haemolysis. The biochemical basis of the accelerated destruction of the red cells is discussed.

Résumé

L'observation d'une maladie atteinte d'un manque en glucose-6-phosphat dehydrogénase et chez lequel une crise hémolytique survient à la suite d'une intoxication au plomb d'une degré moyen, occaision à la confrontation du rôle que ces deux facteurs ont joué dans la pathogénèse de l'anémie. Les altérations hématologiques causées par le plomb—l'hémolyse, la perturbation de la synthèse de la globine et de l'hème—ainsi que celle causée par le manque de G-6-PD sont décrites. Il semble que le plomb n'intervienne pas dans le métabolisme des érythrocytes en tant qu'agent oxydant, comme est le cas dans le favisme typique, mais que les groupes sulfhydryles soient directement bloqués. La destruction des cellules se fait de la même façon que dans les hémolyse médicamenteuses. Les possibilités biochimiques favorisant la destruction accélérée des érythrocytes sont discutées.

Literatur

1. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
2. BERNARD, J. et PONS, P. L'absence de glucose-6-phosphat dehydrogénase et l'absence de phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 11, 477 (1964).
3. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
4. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
5. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
6. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
7. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
8. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
9. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).
10. BERNARD, J., NAJARI, Y., SCHARON, C. et T. de J. Les crises hémolytiques du déficit en glucose-6-phosphat dehydrogénase. *Bull. Soc. Path. Exot.* Paris 115, 437 (1964).

- 10 COMER, G. AND HOCHSTEIN, P. Primaquine induced generation of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Blood* 20: 785 (1962)
- 11 ESCOBAR, M. A. HELLER, P. AND T. OMAJON, F. E. "Complete erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch. Intern. Med.* 114: 428 (1964).
- 12 FRATLIONE, R. B. GRIGGS, R. C. AND HARRIS, J. W. Antosurvival of erythrocytes treated in vitro with lead chloride. *Clin. Res.* 7: 384 (1958)
- 13 GRIGGS, R. C. AND HARRIS, J. W. Erythrocyte survival and heme synthesis in lead poisoning. *Clin. Res.* 6: 188 (1958)
- 14 HARRIS, J. W. *The Red Cell: Production, Metabolism, normal and abnormal* (Harvard University Press 1963)
- 15 HEYDEMANN, H. H., FASSER, U. UND STROEMER, G. Chronischer nicht sphärocytärer hämolytischer Ikterus bei völligem Fehlen der Glucose-6-phosphatdehydrogenase Aktivität der Erythrozyten. *Klin. Wochs.* 42: 1250 (1964)
- 16 KIRDMAN, H. N. RILEY, H. D. AND CROWELL, B. B. Different enzymic expressions of mutants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46: 938 (1960)
- 17 LÖNN, G. W. *Favismus in Leberwiesens Erbliche Stoffwechselerkrankheiten* (Urban & Schwarzenberg, München 1962)
- 18 LÖNN, G. W. UND WALLER, H. D. Zur Biochemie einiger angeborener hämolytischer Anämien. *Folia haemat.* N F 8: 377 (1963)
- 19 LÖNN, G. W. UND WALLER, H. D. Eine neue enzymopathische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel. *Med. Klin.* 57: 1522 (1962)
- 20 MARIAS, R. A. AND GROSS, R. T. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: evidence of differences between negroes and caucasians with respect to this genetically determined trait. *J. clin. Invest.* 38: 2253 (1959)
- 21 MAUDERALL, D. Normal porphyrin metabolism. *J. Pediatrics* 61: 5 (1964).
- 22 MOWLER, D. N. UND CROCKETT, C. C. Hereditary hemolytic disease secondary to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Report of three cases with special emphasis on ATP-metabolism. *Blood* 23: 427 (1964).
- 23 OORT, M. L., LOON, J. A. AND PRIMO, H. K. Hereditary absence of reduced glutathione in erythrocytes. A new clinical and biochemical entity. *Nor. Scand.* 4: 370 (1961)
- 24 PORTER, I. H., BOYER, S. H., WATSON-WILLIAMS, E. J., ADAM, A., SZENDERO, A. AND SYNGALCO, M. Variations of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different populations. *Lancet* i: 883 (1964)
- 25 RAFFORT, S. AND SCHERER, D. Mechanism of maintenance and maturation of the 5H-enzyme. *Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon 1963*, p. 648 (Harger Basel/New York 1963)
- 26 RICHON, A., ASKERKAN, I., RAMOT, B. AND SAKRA, S. Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects: activation by stroke of normal erythrocytes. *Biochem. biophys. Comm.* 2: 128 (1960)
- 27 SAKO, S. The effect of mitochondria on porphyrin and heme biosynthesis in red blood cells. *Acta haemat. jap.* 21: suppl. 2, 337 (1958)
- 28 SZENDERO, A., ADAM, A., KAPLAN, V., STERN, R., TOLEDO, R., ZAMMAN, J. AND SAKRA, C. Investigation of the mechanism of nitrofurantoin induced hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient subjects. *Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon 1963*, p. 637 (Harger Basel/New York 1963)
- 29 WHITE, R. *Transport and Diffusion in Red Blood Cells* (Arnold, 1964)

Department of Clinical Laboratory Sciences and Pathology, University of Mississippi
Medical Center, Jackson, Miss.

The Sickling Phenomenon in a White Male Without Hb S

R. B. THOMPSON, P. J. RAU, J. ODOM AND W. N. BELL

The sickling phenomenon first observed in 1910 (4) is the result of molecular aggregation, long chain polymer formation and tactoid formation within the cell due to the gelling of Hb-S in a reduced state. It had been said that a positive sickle cell preparation test definitely indicates the presence of Hb-S. However, there are reports (3, 7, 12) of other abnormal hemoglobins producing a sickle distortion of the erythrocytes. Recently we had the opportunity of studying a fast moving hemoglobin in a 61 year old white male who, despite the absence of Hb-S in his cells demonstrated a positive sickling test with sodium metabisulfite. Because of these findings, the following observations were made.

Methods

Routine hematologic procedures for hemoglobin, hematocrit, red blood count, reticulocyte count, osmotic fragility, hemoglobin electrophoresis, and quantitation of the major and minor fractions were performed as outlined in an earlier procedure (12). Through hybridization studies (Suzuta *et al.*) (10) and structural studies of AICHA YAMA (6), the hemoglobin subsequently designated as Hb-I was identified. The results of these studies will be elucidated in a later publication. Solubility studies using the method of ITANO (5) were performed and the sickle cell preparation procedure was performed using 3, 6, and 9% sodium metabisulfite.

Clinical History

A 61 year old male was admitted to the University of Mississippi Medical Center for evaluation of chronic peptic ulcer of five years duration. Physical examination at this time revealed a well developed, well nourished white male with blood pressure 140/90, pulse 68, and temperature 98.6 °F. There were no palpable nodes, liver or spleen.

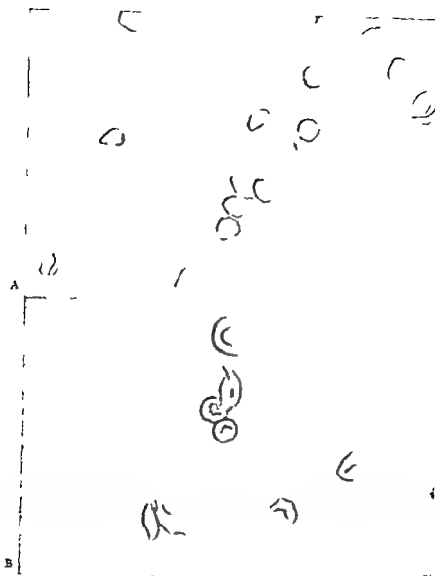


Fig 1 (A) A sickle preparation procedure on blood of the case under study using 3% sodium metabisulfite after 40 minutes incubation (450 \times). Frequent bowl and crescent shaped cells are present. (B) A sickle preparation using 6% sodium metabisulfite 20 minutes after incubation (450 \times)

The pertinent laboratory data was as follows: hemoglobin 16.3 gm, hematocrit 50%, RBC 5,380,000/cmm, and reticulocyte count 1%. By error a sickle cell preparation procedure with 3% sodium metabisulfite was done and reported as positive (Fig 1A). Hemoglobin electrophoresis (Fig 2) revealed a fast moving compo-



Fig 2. Starch gel electrophoresis pH 8.1 (benzidine stain) on selected hemoglobin hemolysates, (a) thalassemia trait with elevated Hb-A₂, (b) cord blood hemolysate containing Hb-Bart⁺ and H, (c) Hb-I (case under study) and (d) Hb-A₁-B₂.

ment with Hb-A and Hb-A₂. Quantitation of the hemoglobin fractions revealed the fast moving fraction to comprise 27% of the total hemoglobin and Hb-A₂ 4.8%. Serum iron was 90 mcg, iron binding capacity 295 mcg, and osmotic fragility was normal. A Cr⁵¹ survival revealed a half-life of 20 days (normal 25-33 days). The chest and long bones were normal on X-ray examination.

Subsequently we were able to study three family generations (Fig 3) including the patient's immediate offspring and were able to identify this fast component in 15 of 22 family members studied. In addition, we were able to trace the family ancestry through 11 generations, evidence was unearthed showing that the family tree began with a Caucasian Irish male who married an American Seminole Indian.

FAMILY M

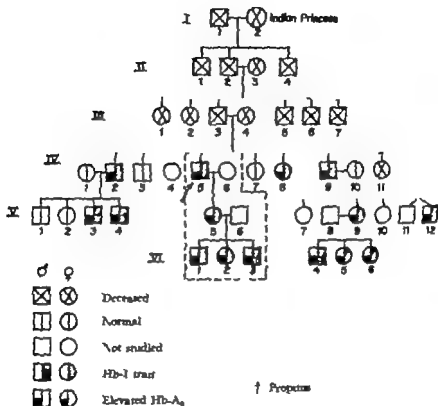


Fig. 3. Pedigree of proband IV-5 (case under study)

Results

If we analyze the hematologic data we are from electrophoresis that the patient possesses a fast moving hemoglobin component with a mobility slightly more anodal than Hb-Bart's. By DEAE cellulose chromatography this fast moving component comprised 20-30% of the total hemoglobin in the affected family members. Hb-A₂ was elevated in all Hb-I carriers (3.8-4.8%) and normal in the non affected members.

When the red cells were exposed to 3° sodium metabisulfite the red cells initially became target like or bowl shaped and after 30-60 minutes the characteristic sickle or whorl forms appeared (Fig 1A). The appearance of the cells were so characteristic of classic sickle cells that they passed as a positive sickle preparation on examination by several qualified technicians. Attempts at reoxy

genation of the treated blood were without effect. The solubility of the hemoglobin in reduced form was 90% as compared to 50% for Hb-AS

Discussion

The interesting phenomena in the case under discussion are twofold, namely (a) the change in shape of red cells in a manner reminiscent of true sickling when exposed to 3 and especially 6% sodium metabisulfite and (b) the elevation of Hb-A₂ in view of a normal osmotic fragility

No obvious explanation for the sickling phenomenon could be found but it was supposed as suggested by ATWATER (1) that the sodium metabisulfite was principally responsible for the sickling phenomenon, directly through its action on the red cell membrane. Six per cent metabisulfite enhanced the sickle phenomenon in less time (20-30 minutes) (Fig 1B) no differences were noticed between 6 and 9% solutions. The typical birefringence associated with Hb-S was not present when samples of blood were examined by polarized light. It could not be evaluated on the sickle preparations as sodium metabisulfite exhibits birefringence. Some clumping of hemoglobin was noticed centrally but the characteristic polymerization and tactoid formation seen in sickle cell disease were lacking. Thus, it was believed that sodium metabisulfite acted directly on the red cell membrane. ATWATER *et al* (1) reported similar findings in a 25 year old Negro woman but here the percentage of Hb-I was considerably higher than in our case, namely 70%. She postulated since approximately 50% of the dry weight of stroma was made up of solidly bound hemoglobin, that the high concentration of the abnormal hemoglobin in the patient under study may have an effect on the biochemical characteristics of the stroma and might explain its unusual response to sodium metabisulfite. In our case, only about 25 per cent of the stroma was composed of hemoglobin.

The elevation of Hb-A₂ in view of a normal osmotic fragility and a low normal cell survival brings up the question of whether one is dealing with a double heterozygosity namely Hb-I and beta thalassemia of the type designated by CEPPELLINI (2) as elevated Hb-A₂ without morphologic thalassemia. In Atwater's case, Hb-A₂ values were low or normal while in the case described by RUCKENAGAL (8, 9) and THOMPSON *et al* (11) Hb-A₂ ranged from 1.7 to 2.5.

The finding of Indian ancestry in our family is consistent with the finding of RUCKENAGAL AND ATWATER who reported Indian features and a history of Indian ancestry in their family studies. This hemoglobin, an extremely rare variant of human hemoglobin has a considerably lower isoelectric point than Hb-A and an unusually fast electrophoretic mobility at pH 8.1

Acknowledgments. The authors wish to express thanks to Mr F. MARCUM for assistance in obtaining blood samples from all available family members to the Clinical Research Center (Public Health Service Grant GCRC FR 91) to Mr JAMES GOODMAN and the Department of Medical Illustration and to the secretarial assistance of Miss K. GROWER. This study was supported by N. I. H. Grant (A55-07943-02 (Hem.)

Summary

The sickling of erythrocytes in a 61 year old white male whose hemoglobin electrophoresis disclosed a Hb-hemoglobin A+I pattern with no Hb-S is described. Hb-I comprised 20 to 30% of the total Hb-hemoglobin and Hb-A₂ 3.5 to 4.8%. Sickling tests were positive with 3% and consistently positive with 6% metabisulfite. The unusual finding of sickling of red cells despite the absence of Hb-S is believed to be due to an abnormality of the red cell stroma possibly as a result of the sodium metabisulfite on the red cell membrane.

Résumé

La formation d'érythrocytes falciformes chez un homme blanc de 61 ans est décrite. L'électrophorèse mit en évidence une combinaison d'hémoglobine A+I, sans hémoglobine S. L'hémoglobine I comprenant 20 à 30% de l'hémoglobine totale et l'hémoglobine A₂ 3,5 à 4,8%. Les tests de formation d'érythrocytes falciformes étaient positifs avec une solution de 3% de métabisulfite et tout spécialement à une concentration de 6%. La formation inhabituelle d'érythrocytes falciformes en l'absence de Hb-S est attribuée à une anomalie du stroma des érythrocytes et est peut-être le résultat de l'effet de métabisulfite de sodium sur la membrane des érythrocytes.

Zusammenfassung

Es wird über die Bildung von Sichelzellen berichtet bei einem 61 Jahre alten Mann, bei dem die Hämoglobinelektrophorese eine Kombination von Hb A und Hb I jedoch kein Hb S ergab. Das Hb I betrug 20 bis 30% das Hb A₂ 3,5 bis 4,8% des gesamten Hämoglobins. Der Sichelzellttest fiel positiv aus mit 3% und regelmäßig mit 6% Metabisulfit. Der ungewöhnliche Befund einer Sichelzellerbildung trotz Fehlen von Hb S kann durch eine Anomalie des Erythrozytenstromas bedingt sein, vielleicht auch durch einen Einfluß des Metabisulfits auf die Erythrozytenmembran.

References

1. ATWATER, J.; SCHWARTZ, R. L.; EMBLEY, A. J.; MONTGOMERY, T. L. AND TOGAYEN, L. M. Sickling of erythrocytes in patient with thalassemia Hb-I disease. *New Engl. J. Med.* 263: 1215 (1960).
2. BANNERMAN, R. M. Thalassemia. A survey of some aspects. p. 53 (Grune and Stratton, New York 1962).
3. EWE, L. I. L. Hemoglobin "Bart's" and the sickling phenomenon. *Nature* 191: 1314 (1961).
4. HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in case of severe anemia. *Arch. Int. Med.* 6: 517 (1910).
5. ITANO, H. A. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobins. *Arch. Biochem.* 47: 148 (1953).
6. MICHAEL, M. Peptide patterns: fingerprinting of hemoglobin. *Applied Seminar on Clinical Pathology of Hemoglobin, Its Precursors and Metabolites*. Washington, D. C. Assoc. Clin. Sci. 1962.
7. FIDLER, L. E., RAY, C. E. AND MCCOY, K. A new hemoglobin variant with sickling properties. *New Engl. J. Med.* 268: 862 (1963).
8. PAGE, E. B.; ROCKWOLD, D. K. AND JENSEN, W. N. Clinical and genetic studies of new inherited abnormality of hemoglobin characterized by rapid electrophoretic mobility. *Clin. Res. Proc.* 3: 67 (1955).
9. SUGI, A., S. ITOH, I. SATOH, U. MIYAJI, T. AND TAKEIDA, I. Agar gel electrophoresis of the hybrid of canine and human hemoglobins. A simple convenient means for the determination of the chain anomaly. *Acta Haematol. Japonica* 25: 675 (1962).
10. THOMPSON, O. L.; MORELAND, H. J.; SMITH, G. W.; BOWMAN, B. H.; ALEXANDER, M. J. AND SCHWENKER, R. G. A family with Hb-L. *Blood* 22: 313 (1963).
11. THOMPSON, R. B., MITCHELL, J. W. AND HUBMAN, T. H. J. Studies on the fetal hemoglobin in the Perleminst High Hb-F anomaly. *Blood* 18: 257 (1961).
12. THOMPSON, R. B. AND FLOWERS, C. H. Observations on the sickling phenomenon. *Amer. J. Med. Tech.* 29: 379 (1963).

Authors' address: Drs. R. B. Thompson, P. J. Rice, J. Odum and W. H. Bell, Dept. of Clin. Lab. Sciences and Pathology, Univ. of Mississippi Med. Center, Jackson, Miss. (U.S.A.)

From the Department of Pediatrics, Medical School of Ankara University Ankara, Turkey and the Department of Internal Medicine Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

A Further Example of Thalassemia Hemoglobin E Disease in Turkey

A. OKÇUOĞLU VIRGINIA MINNICH AND A. ARCAŞOY

Hemoglobin E was first described independently from two laboratories in 1954 (9 13) This new hemoglobin was found to be most characteristic for people from the Far East (2, 5 7) However since then it has been observed infrequently in other parts of the world (2, 5)

Hemoglobin E has been encountered in 4 forms 1 the heterozygote form in combination with normal hemoglobin A, 2 in the homozygote state (17) 3 in association with the genes for both alpha and beta thalassemia (19) 4 and in combination with hemoglobin S (3 11)

Thalassemia hemoglobin E disease appears when the genes for thalassemia and hemoglobin E are combined in the same person. Usually one parent is a carrier for the thalassemia gene and the other for hemoglobin E. Like hemoglobin E, thalassemia-hemoglobin E disease has its highest frequency in the Far East, particularly in Thailand (7 9)

The purpose of this report is to describe the first case of thalassemia hemoglobin E disease in Etn Turka. This is the second report of this disease from Turkey

Methods

Routine hematological methods were employed. Fetal hemoglobin was determined by the alkali denaturation method of Seruya *et al.* (18) Starch block electrophoresis was done by Kowal method (14) using both Turkish starch (15) and starch obtained from America.

Case History

S. Y 6 years old girl from Adana was admitted to the hospital with the history of high fever pallor and chills of 10 days duration. Her family belonged to the ethnic

Table I

Hematologic data in the family with thalassemia-hemoglobin E disease.

	Hb %	RBC 10 ⁶ /mm ³	Hct %	WBC mm ³	Retic. %	MCV fl ³	MCH fl ³	MCHC %	NRBC /100 WBC
Patient	5.5	3.87	18	10,400	2.0	47	14	30	2
Mother	13.8	6.00	38	8,840	1.6	64	23	36	0
Father	14.0	7.72	45	8,400	0.8	64	20	31	2

Table I (continued)

	Anem.	Pol.	Hypo.	Target cells	Spher.	Series iron fl ³ %	TIBC ^a
Patient	++++	++++	+++	++	++	73	343
Mother	+	+	+	+	+	—	—
Father	+	++	++	0	0	—	—

Total iron-binding capacity

Table II

Hemoglobin analysis in the family with thalassemia-hemoglobin E disease.

Members of the family	Sex	Age, yrs.	Hemo- globin A ₂ %	Hemo- globin E %	Hemo- globin A ₁	Hemo- globin F %
Patient	F	6	11.8	78.2	—	10.0
Mother	F	34	75.0	25.0	—	0.9
Father	M	57	92.7	0	4.7	2.9
Sibling	F	8	67.0	32.0	—	1.0
Sibling	F	11	93.0	0	5.8	1.2
Sibling	F	4	73.0	27.0	—	—
Sibling	F	9	67.8	31.0	—	1.2
Sibling	M	14	96.8	0	3.2	0.8

0- Not present

Not done

group of E₂-Turks. She was noted to have intermittent abdominal pain and darkness in the urine during the last 2 years.

Physical examination revealed a fairly well developed and well nourished girl, with pallor and muddy color. There was no mongoloid facies nor were gross skeletal changes seen as in thalassemia major. The liver was palpated 5 cm below the right costal margin and the spleen was enlarged 2 cm below the left costal margin; no petechiae or obvious purpura were noticed. The hematological data are shown in Table I. The hemoglobin analysis on the entire family is summarized in Table II. Bone marrow examination revealed normal cellularity with slight increase in erythroid elements. Iron granules were found to be present with Prussian blue stain, erythroid hyperplasia was not as marked as would be expected in severe hemolytic anemia. This last finding was thought to be due to superimposed infection. X-ray studies revealed only trabecular striation in bones and minimal cardiomegaly. Liver function tests, serum total proteins were within normal limits as was the Coombs test.

I view of her daily fever spike and chills, malaria, kala-azar, typhoid fever and brucellosis were searched for by appropriate studies but only positive test for brucella was found. She was treated with antibiotics and transfusions. Each she responded well.

DISCUSSION

The hematological and genetic findings are compatible with the diagnosis of thalassemia hemoglobin E disease in this girl. The pedigree studies (Fig. 1) revealed that the father had classical thalassemia minor with elevated hemoglobin A₂ and the mother was a carrier for hemoglobin E. Furthermore, three siblings were heterozygous for hemoglobin E, one for thalassemia and one was normal.

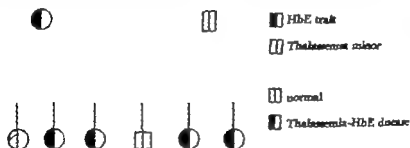


Fig. 1 Family with thalassemia hemoglobin E disease.

The marked variability of the symptom complex associated with thalassemia hemoglobin E disease is well known (10). Our case seems to represent a moderately severe form of the syndrome as signs of impaired health and transfusion requirement did not appear until 6 years of age. Lack of growth retardation and changes in skeletal system is also in favor of the moderate form. Thalassemia—hemoglobin E disease, however, may easily be confused with COOLEY'S anemia or any other of the thalassemia hemoglobin disorders, as the clinical and routine hematologic manifestations are not sufficiently distinctive (11). Therefore, the electrophoretic studies still remain the most important tool for diagnosis.

The patient's blood picture was characterized by a severe hypochromic microcytic anemia. Reticulocytes were found to be only slightly elevated; perhaps superimposed infection of brucella may have accounted for this. Nucleated red cell, target cells, and spherocytes were also observed as has been described previously in this disease (10).

Hemoglobin analysis (Fig. 2, 3) revealed that the father had an elevated hemoglobin A₂ to 4.7% and slight rise in fetal hemoglobin to 2.9%. The mother's hemoglobin consisted of 25% hemoglobin E.

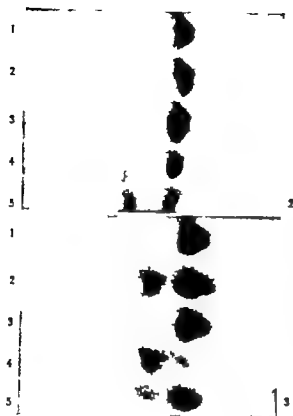


Fig 2. Starch block electrophoresis using Turkish starch.

- 1 Brother of the patient, normal
- 2 Sister of the patient, thalassemia minor (elevated A_2)
- 3 The father thalassemia minor (elevated A_2)
- 4 Sister of the patient, hemoglobin E trait (A E)
- 5 Sister of the patient, hemoglobin E trait (A E)

Fig 3. Starch block electrophoresis (American Starch) pH 8.6.

- 1 Normal
- 2 The mother hemoglobin E trait (A E)
- 3 The father thalassemia minor (elevated A_2)
- 4 The patient, hemoglobin E and A + F
- 5 A E control

and the remainder was hemoglobin A. The majority of the patient's hemoglobin was hemoglobin E, 78.2%. Hemoglobin F by alkali denaturation accounted for 10% of the total. This value is moderately low for thalassemia hemoglobin E disease but it is com-

parable to the values reported by other investigators (7) Hemoglobin A in our patient was calculated from the amount of A+F determined on starch block electrophoresis minus the alkali denaturation value. As has been reported previously hemoglobin A may be present in small amounts in cases of thalassemia—hemoglobin E disease (7)

It is of interest that the patient belonged to an ethnic group so-called Etn-Turks, who are generally located in the southern part of Turkey. They represent a population with the highest incidence of hemoglobin S (16.8 %) in the white race (4). The thalassemia gene has also been encountered infrequently in this community (2). Cases with thalassemia minor and major have been described from this region (1). Because of the higher incidence of hemoglobin S occurrence of hemoglobin S-thalassemia disease was more frequently observed in this group in the forms of sickle cell-alpha thalassemia and sickle cell beta thalassemia combinations (8, 7).

However the incidence of hemoglobin E in Etn-Turks was low 1.37% (2, 3) therefore, one would expect fewer cases of thalassemia hemoglobin E disease than that of thalassemia-hemoglobin S combination. In fact, the case presented herein is the first of thalassemia hemoglobin E disease among Etn-Turks. The previous reported cases from this country were observed in Turkish immigrant families from Greece (7). The only other family of thalassemia hemoglobin E disease not related to the Far East has been reported by GOUTTAS *et al.* in Greece (12).

Summary

Thalassemia-hemoglobin E disease is described in a 6 years old girl of Etn-Turks. The patient displayed a moderately severe form of the disease and had an associated infection of brucellosis. The genetic studies revealed that the father had classical thalassemia minor and the mother was a carrier for hemoglobin E. Three siblings were found to be heterozygous for hemoglobin E, one for thalassemia and one was normal. This is the first report of thalassemia-hemoglobin E disease in Etn-Turks and the second from Turkey.

Résumé

Nous rapportons le cas d'une fillette éturque âgée de six ans atteinte d'une thalassémie combinée à une maladie d'hémoglobine E. La malade avait une forme modérément grave de cette maladie et était en même temps atteinte d'une brucellose.

Les études génétiques démontrèrent que le père avait une thalassémie mineure classique et que la mère était porteuse du trait d'Hb-E. Trois frères et sœurs étaient hétérozygotes quant à l'hémoglobine E, un l'était quant à la thalassémie et un autre était normal. Il s'agit du premier rapport de maladie Hb-E et de thalassémie combinées chez des éthyriens et du deuxième cas en Turquie.

Zusammenfassung

Es wird über eine Kombination von Thalassämie und Hämoglobin-E-Krankheit bei einem 6 Jahre alten Mädchen türkischer Abstammung berichtet. Das Kind war eine mittelschwere Form der Krankheit auf und hatte gleichzeitig eine Brachyurie. Die genetischen Untersuchungen ergaben, daß der Vater eine klassische Thalassämia minor hatte und die Mutter Trägerin des Hb-E-Merkmals war. Drei Geschwister waren heterozygot für Hb E, eines für Thalassämie und eines war normal. Es ist dies die erste Mitteilung einer Thalassämie-Hämoglobin-E-Krankheit bei einem türkischen Patienten und der zweite Fall in der Türkei.

References

1. ARSOY M. Sickle-cell anemia in south Turkey. A study of fifteen cases in two white families. *Blood* 11: 460 (1956).
2. ARSOY M. The hemoglobin E syndromes I. Hemoglobin E in Ed-Turks. *Blood* 15: 606 (1960).
3. ARSOY M. The hemoglobin E syndromes II. Sickle cell-hemoglobin E disease. *Blood* 15: 610 (1960).
4. ARSOY M. Hemoglobin S in Ed-Turks and the Alewuts in Lebanon. *Blood* 17: 657 (1961).
5. ARSOY M. Hemoglobins S and E in Turkish people. *Nature* 193: 786 (1962).
6. ARSOY M. The first observations of homozygous hemoglobin S-alpha thalassemia disease and two types of sickle cell thalassemia disease. a) Sickle cell-alpha thalassemia disease b) Sickle cell-beta thalassemia disease. *Blood* 22: 737 (1963).
7. ARSOY M., GÜTTORF A. I., KOCABALKAN, N., SEYTAOĞLU D., ALADAĞ, T., SEÇER, F. and BOSTANCI, N. Thalassaemia-hemoglobin E disease in Turkey with hyper-splenism in one case. *Am J Med.* 36: 831 (1963).
8. ARSOY M. and LEVYMAN, H. Sickle cell thalassemia disease in south Turkey. *Brit. med. J.* 731 (1957).
9. CHERNOFF A. I., MINGOCH, V. and CHROVCHARENKO, S. Hemoglobin E, hereditary abnormality of human hemoglobin. *Science* 70: 605 (1954).
10. CHERNOFF A. I., MINGOCH, V., NAYLOR, S., TCHIN, S., KAREMLIAN C. and CHERNOFF R. R. Studies on hemoglobin E. *Blood* 47: 455 (1956).
11. DACEL J. V. The Hemolytic Anemias, p. 271 (Churchill, London 1963).
12. GOUTYAS A., THIVREUX, H., RONDON, C., PAPAYIANN, A. et GARRIE, M. L'hémoglobine E en Grèce. *Sang* 31: 1 (1960).
13. IANO, H. A., BARBERA, W. R. and STENGROV, P. A fourth hereditary hemoglobin. *J Amer Chem Soc* 76: 2278 (1954).
14. KNEEL, H. G. and VALLANCE, G. New hemoglobin in normal adults blood. *Science* 127: 268 (1955).

15. MINNICH, V. ARCAVOY A. AND OKÇOGLU, A. The use of Turkish starch for hemoglobin electrophoresis (to be published)
16. NA-NAKORN, S. MINNICH, V. AND CHERNOFF A. I. Studies on hemoglobin E II The incidence of hemoglobin E in Thailand. *Blood* 47: 490 (1956)
17. NA NAKORN, S. AND MINNICH, V. : Studies on hemoglobin E III Homozygous hemoglobin E and variants of thalassemia and hemoglobin E. A family study. *Blood* 12: 529 (1957).
18. SEVIER, K.; CHERNOFF A. I. AND SEAGER, L.: Studies on abnormal hemoglobins I. Alkali denaturation. *Blood* 6: 415 (1951)
19. TUCKERDA, S. RUCKENAGEL, D. L. MINNICH, V. BOONTAPRAKON, U. BALAKRUA, K. AND SUVATER, V. The coincidence of the genes for hemoglobin E and alpha thalassemia in Thais, with resultant suppression of hemoglobin E synthesis. *Amer J human Genet.* 16: 311 (1964)

Authors' addresses: Dr. A. Okçoglu, and A. Arcavoy Dept. of Pediatrics, Med. School of Ankara University Ankara (Turkey). Dr. V. Minnich, Dept. of Internal Medicine, School of Medicine Washington University St. Louis, Mo. (USA).

Department of Therapeutics, the Royal Infirmary Edinburgh

A Case of Autoimmune Haemolytic Anaemia, Thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré Syndrome

F. A. ALA AND D. J. C. SHEARMAN

In recent years there has been a tendency to attribute diseases of unknown aetiology to disorders of immune tolerance. One such condition is known as Landry-Guillain-Barré syndrome (20, 23) although the evidence for the inclusion of this condition in the lists of autoimmune diseases is for the most part inconclusive (6, 19). It is the purpose of this paper to report the occurrence of what we considered to be the Landry-Guillain-Barré syndrome in a patient known to be suffering from idiopathic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. The onset of warm antibody autoimmune haemolysis in a patient who has previously had splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura is, in itself, very uncommon (10, 12, 25-29). The occurrence of this particular neurological syndrome in such a richly varied context of 'self'-intolerance lends support to the theory that it also is a disorder of autoimmune aetiology.

Case Report

Thrombocytopenia. The patient, G. S. (born in 1925) first developed purpura and bruising in May 1945. The purpura was widespread and acute but resolved within a week. In 1949 he was admitted to another hospital with haematuria, bleeding gums and extensive bruising and purpura of one week's duration. Haemoglobin was 11.7 g% platelets less than 10,000/mm³ and WBC 3,400/mm³ with normal differential count. How's test was negative but the bleeding time was over 20 min. A marrow smear showed megakaryocytic hyperplasia. In May 1949 splenectomy was carried out. The spleen was roughly assessed as being enlarged to twice the normal size but it was histologically normal. He made an excellent recovery and no further bleeding tendency was noted, although post-operative rise in platelets did not take place. In February 1956, he was first admitted to the care of Prof. Sir E. Denton in the Royal Infirmary Edinburgh, with recrudescence of thrombocytopenia and an extensive purpuric rash on both legs. Platelets were found to be 40,000/mm³. Cortisone acetate, 300 mg/day relieved the purpura but his platelet count did not rise. The purpura recurred in August 1956.

Pre-antral air insufflation demonstrated no spleniculi and platelet agglutination studies were negative. He was discharged in September 1958, with a strongly and persistently positive faecal occult blood platelets were 20,000 mm^3 . By July 1958, platelets had risen to 350,000 mm^3 and cortisone was stopped.

Onset of haemolysis: The patient was readmitted to hospital in September 1958, with pallor and jaundice which followed a week of increasing tiredness, sweating and nausea. The liver edge was tender and enlarged two fingers' breadth below the right costal margin. Haemoglobin was 8.5 g% serum bilirubin 2.9 mg% and the urine showed much urobilinogen. Direct Coombs' test was strongly positive. The platelet count was 425,000 mm^3 and remained normal thereafter. Three days later his haemoglobin dropped catastrophically to 2.5 g% and he was transfused with 27 pints of packed cells over the next three weeks. Prednisone 60 mg and intravenous hydrocortisone 300 mg were administered daily and he gradually improved. Within a month the haemoglobin level was maintained at 13.1 g% on 10 mg of prednisone daily.

The neuropathy: On 20th December 1958, he first developed increasing weakness of the lower limbs which was more marked on the left side. He walked on 'broad base' with 'waddling' gait. Weakness progressed rapidly and by January 8th, 1959, he had lost all tone in the muscles supplied by L5-S1 and was unable to stand. Knee jerks were weak and ankle jerks were absent. Bladder and bowel function was normal. There was no subjective disturbance of sensation and examination demonstrated no sensory deficit. The CSF showed protein 250 mg/100 ml, 5 cells per mm^3 with normal pressure and dynamics. Myelography showed no cord compression. Wasting of muscles was minimal and by February 1959 a gradual return of movement began. Thereafter he made a complete recovery with full return of power and function and in October he returned to work.

Two years later in March, 1961 a further episode of neuropathy brought him back to hospital. He had experienced spreading numbness and tingling of the left leg, which soon involved the right lower limb. Both legs became increasingly weak and they would not support him. On examination there was profound weakness of the hip flexors and abductors, hamstrings, lateral peroneal and left extensor hallucis longus but no wasting of the muscles. Paraesthesiae appeared to be localised to the L5-S1 territory but there was no proprioceptive or exteroceptive deficit and X-rays of this region were normal. Knee jerks were very brisk and there was bilateral sustained ankle clonus. Both plantar responses were extensor. The nervous system was otherwise normal. Several preparations for LE cells were negative and there was no evidence of neuropathy. The serum B_{12} was 255 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The CSF protein was 58 mg% lymphocytes 23 mm^3 and dynamics were normal. A collagenosis with arteritis and occlusive cord damage was still considered the most likely diagnosis and prednisone was consequently given at dose of 50 mg/day.

By April, 1961 weakness had improved although the legs were spastic and both plantars were extensor. There was a slight increase in weakness three weeks later. The CSF protein level was 114 mg%, lymphocytes 20 mm^3 WR negative and colloidal gold test 112221200. Serum protein electrophoresis gave a total protein of 5.7 g% 3.6 g% albumin globulins alpha₁ 0.3 g% alpha₂ 0.8 g% beta 1.0 g% and gamma 1.0 g%. The blood count showed total WBC of 3,000 mm^3 with 64% lymphocytes, majority of which were atypical. The Paul Bunnell test was not done. Power gradually returned to both legs and by June, 1961 he was able to walk with sticks. CSF protein subsided to a level of 50 mg% but the abnormal neurological signs persisted. Prednisone was reduced to 10 mg daily. In November there was only residual ataxia and spasticity but the plantars remained extensor until February 1962.

Relapse of haemolysis: Early in December 1963, this patient was readmitted with severe biliary colic and vomiting. There was bilirubinuria and the haemoglobin level

had dropped to 10.7 g%. In retrospect it was at this point that an upper lobe opacity first appeared in the right lung which subsequently proved to be tuberculous. Abdominal symptoms were transient and he continued in reasonable health until March, 1964 when his haemoglobin fell to 8.0 g%. Gross urobilinogenuria was present and reticulocytes were 11% ESR 110 mm in the first hour platelets 240,000/mm. A blood film showed polychromasia and anisocytosis, 80 normoblasts per 100 white cells,

few myelocytes, numerous microspherocytes and many red cells containing Howell-Jolly bodies. Haptoglobins were absent and the $T_{1/2}^{51}\text{Cr}$ of red cells was 16 days (normally 23-35 days). The direct Coombs' test was positive to titre of 1:1280 and the reaction was neutralised by the addition of gamma-globulin. The blood group was AB with probable Rh genotype of CDe/cDE. His cells showed autoagglutination which was most marked at room temperature, at 37°C and weak at 4°C. This was consistent with the coating of red cells by antibodies of the 'warm' type. By the coxsone technique his serum agglutinated all of a large panel of cells and no certain evidence of blood group 'specificity' was detected. By the indirect Coombs' test, however, the serum was compatible only with cells of the Rh genotype CDe/CDe reacting specifically with cells possessing *c* and *E* antigens. An eluate prepared from his red cells gave identical reactions.

Steroids were increased to 60 mg prednisone daily and the haemoglobin varied between 9.2 and 10.7 g%, with reticulocytosis of 6 to 12% until June, 1964.

Towards the end of June, 1964 he was readmitted with recrudescence of haemolysis. Blood group specificity could no longer be discerned by the indirect Coombs' test or by cell elution. Haptoglobins were paradoxically present and they remained so throughout July in the presence of brisk haemolysis. Pneumomediastinography (400 cc O_2 by the retrotracheal method) showed no discernible thymic tissue. His haemoglobin fell to 5.1 g% and there ensued a desperate two-and-a-half month period of extremely severe haemolysis. In the course of these 10 weeks, he received a total of 100 units of packed cells—an average of 1.25 units daily. Red cell survival estimated at intervals in this period ($^{51}\text{CrT}_{1/2}$) was 22, 24 and 25 h. At no time was free haemoglobin demonstrated in plasma or urine and Schumm's test for methaemalbumin was persistently negative.

Imuras and Actinomycin C were administered on 20th July 1964. These drugs were discontinued on 6th August, 1964 when WBC dropped to $1.423/\text{mm}^3$ (corrected for normoblasts) although the platelet count remained normal. Haemolysis continued quite unabated during this time. Red cell destruction was uninfluenced by large doses of prednisone and by transfusion of cells washed and warmed to 37°C before infusion.

A persistent cough had developed in the course of July and opacification in the right upper zone was noted on chest X-ray. In August, sudden pleuritic pain in the left axillary region with haemoptysis and pyrexia were attributed to pulmonary embolism and infarction, and he had a left deep venous thrombosis. Chest X-ray showed a large cavity in the anterior segment of the right upper lobe and numerous tubercle bacilli were seen on Ziehl-Neelsen film of sputum. Full antituberculous chemotherapy was initiated on the 24th August, 1964 (streptomycin 1G, PAS 10G, INAH 700 mg/day). The serum haptoglobin level was shown to be grossly increased at this stage to 300 mg% in spite of very severe haemolysis.

Two weeks of antituberculous treatment initially failed to alter his voracious transfusion requirements and a second course of treatment with Imuras was started on 9th September. $T_{1/2}^{51}\text{Cr}$ was 25 h this time. On the 13th September the dose of prednisone was increased to 100 mg/day and red cell destruction gradually subsided over the ensuing three to four weeks. The last blood transfusion was given on the 18th September and, thereafter there was a steady fall in reticulocyte count and serum bilirubin, accompanied by a sustained rise in the haemoglobin level. Imuras was dis-

continued on the 23rd September 1964. On the 27th September 1964 $T_{1/2}^{51}\text{Cr}$ was 33 days and on October 10th it was 23 days. The direct Coombs' remained persistently positive to a titre of 1:640 and the indirect Coombs' was positive.

In the course of a final admission, 6 weeks later when biliary colic and mild recurrent haemolysis were diagnosed, the patient complained of severe breathlessness and chest pain. He collapsed and died soon after. Autopsy showed that the immediate cause of death was massive pulmonary arterial thromboembolism. There was evidence of repeated previous pulmonary embolism. The heart was normal and atherosclerosis was minimal in the major arteries. The brain and spinal cord were carefully examined and showed no evidence of arteritis or thromboembolism. The nerve roots at all levels appeared normal. The peripheral nerves were not examined. The only positive finding was of some degeneration in the columns of Goll at the cervical level.

Discussion

1 CNS findings The first episode of neuropathy was a circumscribed, purely lower motor neurone paresis associated with a high CSF protein—the second, a progressive spastic paresis with extensor plantar responses, occurring in the same segmental distribution and accompanied by paraesthesiae and raised CSF protein. Both episodes were afebrile and self limiting and complete resolution of signs and symptoms eventually took place.

Spinal vascular occlusion might reasonably be invoked, particularly in view of the subsequent history of repeated deep venous thrombosis with pulmonary emboli. Reference has been made by DREYFUS *et al.* (14) and YOUNG *et al.* (30) to the frequency of superficial and deep thrombophlebitis accompanying intense haemolysis. CHRISTEN *et al.* (8) also noted ischaemic ECG changes in similar cases which they attributed to microthrombi formed by agglutinated erythrocytes. Haemolysis was in abeyance, however in the course of both neuropathic episodes. The possibility of polyarteritis or systemic lupus was seriously considered but the complete neurological recovery and the prolonged history of 19 years without emergence of other characteristic features was against a diagnosis of collagen disease with angiopathy. In addition, a fruitless search for anti nuclear factor and LE cells was undertaken during life and at post mortem no evidence of 'vasculitis' was found. Unique in literature is a case of acquired autoimmune haemolytic anaemia (14) who developed neurological phenomena bearing a remarkable resemblance to those of this patient. A three year progressively deepening spastic paraparesis with dorsiflexor plantar responses and paraesthesiae, regressed entirely after splenectomy which also

brought an end to haemolysis. Arteritis and vascular thrombosis would be most unlikely aetiological factors here.

A more likely possibility in this case is a Landry-Guillain-Barré syndrome. A progressive ascending weakness and CSF albuminocytological dissociation are very suggestive. The virtual absence of positive findings on neuropathological examination lend further support to this diagnosis. Spasticity and extensor plantar responses are not commonly associated with Guillain-Barré syndrome although their occurrence in this condition is well documented. J. A. BARRÉ (3) refers to spasticity in a number of cases and BAKER (2) DE MONTER AND STEINMANN (15) POLAN AND BAKER (24) CASAMAJOR AND ALPERT (7) and COSMA *et al.* (9) record extensor plantar responses in this syndrome. Further although histopathological changes in the CNS are less common than lesions of peripheral nerves and anterior horn cells there are a number of writers who have noted diffuse or patchy demyelination in pyramidal tracts and posterior columns (18). It is not uncommon for sensory signs and symptoms to be entirely absent or manifested only as paraesthesiae which may be circumscribed and segmental in distribution (15).

The propositus had a lymphocytosis of $84 / (total\ white\ blood\ count\ 3,000\ mm^3)$ with numerous atypical mononuclears in the course of his spastic neuropathic illness. A test for heterophil antibodies was not carried out, although it is unlikely that he was suffering from infectious mononucleosis in that there were two distinct and widely separated episodes of neuropathy.

PARRONAOZ AND TURNER (22) have noted neuropathies very close to Landry-Guillain-Barré syndrome occurring in allergic states after serum therapy and vaccines and WAXMAN AND ADAMS (27-28) have produced a similar neurological disorder in animals by inducing 'allergy' by the injection of spinal cord and peripheral nerve extracts with Freund's adjuvant. In brief, it is possible that the appearance of atypical mononuclears and the Landry-Guillain-Barré syndrome are both associated manifestations of an allergic state.

The autoimmune basis of this syndrome is still far from secure and demonstration of antibodies is still required to complete the evidence in its favour but the work of WAXMAN AND ADAMS (27-28) ÅSTRÖM AND WAXMAN (1) and MELNIC (20) suggests that this is a feasible postulate.

Although it is not possible to prove our contention conclusively we feel this patient's neuropathy can be placed within the same frame of reference as his thrombocytopenia and haemolytic anaemia and that he represents an example of multiple autoimmunity. This also provides some support for the concept of Landry-Guillain-Barré as an autoimmune disorder.

2 Haptoglobins It has been noted that the serum haptoglobin level in this patient was grossly elevated at 300 mg / when haemolysis was at its peak yet it has been estimated that only 3 g of haemoglobin will normally saturate circulating plasma haptoglobins (17). Assuming 1 l of blood to contain 150 g of haemoglobin, it will be seen that a very minor degree of cell destruction will quickly clear haptoglobins from the circulation.

There are a number of possible explanations for this apparent paradox. BRUS AND LEWIS (5) showed that treatment with steroids caused a progressive rise of haptoglobins in haemolytic states and this rise could not be accounted for by diminution in the rate of cell destruction. Further it is well known that infective and non infective inflammatory states are associated with an elevation of alpha₂ globulin levels, which are partly due to increased haptoglobins. Among the inflammatory states giving rise to increased haptoglobins, tuberculosis has been particularly implicated by JAYLE *et al.* (16). The rapid inflation of a large tuberculous cavity in this patient corresponds with his highest haptoglobin level. We presume that the increased haptoglobin was due to a combination of these several elements of stress, infection and steroid administration. The persistent absence of methaemalbumin and free haemoglobin in plasma must be explained by the immense haptoglobin excess which was present in spite of gross haemolysis.

3 Therapy Although the ultimate prognosis of autoimmune haemolysis with warm antibodies is poorer than in those of the cold antibody type (11) the former group almost always responds to steroid therapy whereas the latter frequently fails to benefit from these drugs. The patient exemplifies this general observation but his refractoriness to conventional doses of steroids in the course of two widely separated episodes of intense haemolysis emphasises the need for persisting with very large doses for an adequate period of time. The number of drugs simultaneously employed during this patient's most recent and severe haemolytic episode makes it difficult to accord therapeutic credit with impartiality. In view of

previous papers reporting the successful treatment of similar cases with cytotoxic drugs (26, 25) we gave Imuran, 150 mg daily together with Actinomycin C (250 μ g weekly by intravenous infusion) in August, 1964. Indeed, a recent report describes the successful use of a cytotoxic drug in Guillain-Barré Syndrome itself (21). These drugs were discontinued after three weeks because of granulocytopenia but a second course of Imuran alone, 150 mg daily was commenced a month later for a period of roughly two weeks. Because of our inability to influence headlong haemolysis in the course of the first regime with these drugs, it is doubtful that the second course of Imuran played any part in terminating haemolysis.

It is remarkable how closely the recrudescence of a dormant haemolytic anaemia coincides with the appearance of radiological evidence of active tuberculosis in December 1963. Respiratory infections are well known to initiate haemolytic relapse in these patients (4) but tuberculosis has rarely been incriminated. DREYFUS *et al.* (14) describe two cases from a series of eight and DACIE (11) found only two of 101 personal cases where tuberculosis was similarly associated with warm antibody autoimmune haemolysis. Our feeling is that control of infection with four weeks intensive anti-tuberculous chemotherapy (during which sputum became negative and chest radiographs showed striking improvement) combined with a sharp increase in prednisone intake (from 30 mg to 100 mg per day) must ultimately be held responsible for improvement. Reduction in red cell destruction began 6 days after the boost in steroid dosage. The failure of response to moderately large doses (up to 80 mg daily) of corticosteroids and cytotoxic drugs earlier in 1964 may have been due to the presence of uncontrolled and as yet undiagnosed infection.

Acknowledgments. We wish to thank Prof. R.H. GOSWOOD for his permission to publish this case. Our thanks are also due to Dr. LAUREN RUSSELL for estimating haemoglobin levels and to Dr. L.W. DILLAMORE for his advice in the preparation of this paper. At the time of this study one of us (F.A.A.) was in receipt of Wellcome Trust Research Grant.

Summary

A case is described of idiopathic thrombocytopenic purpura followed by the occurrence of the Guillain-Barré syndrome and autoimmune haemolytic anaemia. It is suggested that the patient was suffering from multiple diseases of an autoimmune nature and it is postulated that the occurrence of the Landry-Guillain-Barré syndrome

in such a patient lends support to the autoimmune theory of its aetiology. The haemolytic anaemia failed to respond to cytotoxic drugs and the reasons for this are discussed.

Résumé

Un cas de purpura thrombocytopénique idiopathique suivi de l'apparition d'un syndrome de Guillain-Barré et d'une anémie hémolytique par auto-immunisation est rapporté. Il se pourrait que ce malade ait été atteint de plusieurs maladies auto-immunologiques. La présence d'un syndrome de Landry-Guillain-Barré chez un tel malade semble étayer la théorie d'une étiologie auto-immunologique. L'anémie hémolytique n'a pas réagi à l'administration de médicaments cytotoxiques. Les raisons en sont discutées.

Zusammenfassung

Es wird über einen Fall von idiopathischer thrombocytopenischer Purpura berichtet, bei dem ein Guillain-Barré-Syndrom und eine durch Autoantikörper bedingte hämolytische Anämie auftraten. Es wird vermutet, dass dieser Patient mehrere Autoimmunerkrankheiten aufwies. Die Beobachtung bildet eine Stütze für die Theorie, wonach das Guillain-Barré-Syndrom durch eine Autoimmunisierung hervorgerufen wird. Die hämolytische Anämie liess sich durch zytotoxische Medikamente nicht beeinflussen. Die Gründe hierfür werden diskutiert.

References

1. AUSTROM, K. E. AND WAXMAN, B. H. The passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis and neuritis with living lymphoid cells. *J. Path. Bact.* 83: 89 (1963).
2. BAKER, A. B. Guillain-Barré's disease (encephalo-myelo-radculitis) review of 33 cases. *Lancet* 63: 384 (1943).
3. BARRÉ, J. A. Association de déficit central au déficit de type périphérique dans le syndrome polyradiculo-névrite avec dissociation albumino-cytologique. *Rev. neurol.* 75: 251 (1943).
4. BARRON, C. J. C. Disorders of the blood. Ed. Whitby Sir Lionel E. H. and Britton, C. J. C. 9th ed., p. 337 (Churchill, London 1963).
5. BROS, I. AND LEVIN, S. M. The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. *Brit. J. Haemat.* 5: 348 (1959).
6. CAMPBELL, A. M. G. The aetiology of polyncuritis. *Proc. roy. Soc. Med.* 51: 157 (1958).
7. CARAMAJOR, L. AND ALPERT, G. R. Guillain-Barré Syndrome in children: review of literature and report of three additional cases. *Amer. J. Dis. Child* 67: 99 (1941).
8. CHERBON, J. F., JACOTTEY, M. AND WUILLERET, B. Anémie hémolytique immunologique par auto-anticorps. *Helv. paediat. Acta.* 13: 131 (1958).
9. COMA, GAGLIO AND CASTELLANI. Un cas de polyradiculonévrite curable (syndrome de Guillain et Barré). *Rev. neurol.* 69: 708 (1936).
10. DACEY, J. V. The haemolytic anaemias (Churchill, London 1954).
11. DACEY, J. V. The haemolytic anaemias, part 2, pp. 690, 506 (Churchill, London 1962).
12. DACEY, J. V. AND GRUBBY, G. C. DE. Auto-antibodies in acquired haemolytic anaemia. *J. clin. Path.* 4: 233 (1951).
13. DE MOORER, G. AND STENMANN, J. Les polyradiculonévrites; forme aiguë curable forme à évolution fatale. *Presse méd.* 44: 1890 (1936).

14. DREYER, R.; DAINOFF, J. AND VIDAL, G. Essai clinique et hématologique de dosage des d'enzyme hémolytique acquise avec auto-anticorps. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* 6: 349 (1951).
15. HATMAKER, W. AND KERRICK, J. W. Landry-Guillain-Barré syndrome: clinicopathologic report of 50 fatal cases and critique of literature. *Méd. princ.* 28: 59 (1949).
16. JAYLE, M. F.; BOUQUET, G. AND BATAIL, M. J.: Relations entre le taux de l'haptoglobine, celui des globulines 2 et des mucopolysaccharides circulants en pathologie. *C.R. Soc. Biol.* 119: 46 (1935).
17. LAMLEY, G. R., OWEN, J. A. AND PADAVY, R. J. The effect of blood transfusions on serum haptoglobin. *Brit. J. Haemat.* 8: 322 (1962).
18. LAMON, H. C. A. AND FOG, M. Acute polyradiculitis. *Acta med. scand.* 115: 117 (1937).
19. MARSHALL, A. A. Horse serum neuropathy. *Bull. Soc. Path. exot.* 23: 149 (1958).
20. MELNICK, S. C. Thirty-eight cases of Guillain-Barré syndrome: an immunological study. *Brit. med. J.* 1: 368 (1963).
21. PALMER, K. N. V. Polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) treated with 6-mercaptopurine. *Lancet* 1: 773 (1963).
22. PARSONAGE, M. J. AND TURNER, J. W. A. Neuralgic amyotrophy; shoulder-girdle syndrome. *Lancet* 1: 973 (1948).
23. PETTE, E. AND PETTE, H.: Zur Ätiopathogenese der Enzephalomyelencephalomyelitis (einschließlich der akuten multiplen Sklerose) und der Polyneuritis. *Klin. Woch.* 34: 713 (1956).
24. POLAK, C. G. AND BAKER, A. B. Encephalomyeloneuritis. *J. nerv. ment. Dis.* 96: 508 (1942).
25. RICHMOND, J., WOODRUFF, M. F., CLEGG, R. A. AND DONALD, R. W. A case of idiopathic thrombocytopenia and autoimmune haemolytic anaemia treated with thyroid irradiation and by administration of leucran and actinomycin C. *Lancet* 2: 125 (1963).
26. SCHWARTZ, R. AND DANKOFF, W. The treatment of autoimmune haemolytic anaemia with 6-mercaptopurine and thioguanine. *Blood* 19: 493 (1962).
27. WAKEMAN, B. H. AND ADAMS, R. D. Allergic neuritis: experimental disease of rabbits induced by infection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J. exp. Med.* 102: 215 (1955).
28. WAKEMAN, B. H. AND ADAMS, R. D. Symposium on peripheral neuropathies; comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 15: 213 (1956).
29. WAGNER, T. R. Acquired haemolytic jaundice in woman previously splenectomized for essential thrombocytopenia. *Post. haemat.*, Lps. 62: 248 (1952).
30. YOCUM, L. E., MILLER, G. AND CHRISTIAN, R. M. Clinical and laboratory observations on autoimmune haemolytic disease. *Ann. intern. Med.* 35: 507 (1951).

Authors' address: Dr. F. A. Ali and Dr. D. J. C. Thomson, Department of Therapeutics, The Royal Laboratory, Edinburgh (Great Britain).

Varia

Jean Julliard Prize

The second Jean Julliard Prize so named in commemoration of the 1st Secretary General of the International Society of Blood Transfusion, is intended to encourage research work on Blood Transfusion. It will be awarded during the XIth International Congress of Blood Transfusion to be held in Sydney (Australia) from the 24th to the 29th August 1968.

Candidates, under the age of 35 years, should forward, at least 4 months before the opening of the Congress, 4 copies of their unpublished or recently published work to the Secretary General, Dr J P SOULIER, 6 rue Alexandre Cabanel, Paris 13e (France)

The jury for this prize, whose value is sFr 2000.- is composed of Dr. E. FERREL-LEROUX (President); Dr B. T. GOSNOL and Dr M. GROVE-RANDOMER.

Necrologia

Alfred Pinoy

1896—1963

Dr ALFRED PINOY well known internationally for his many contributions to haematological literature died on October 16th, 1963, at the age of 67 years. He had been ill for some time and his friends missed his company.

Forty years ago, he was director of the Laboratory of Pathology at Charing Cross Hospital and later took charge of the Department of Pathology at the Cancer Hospital. In 1926 he gave the Arrie and Gale lecture at the Royal College of Surgeons on 'The importance of haematology in surgery'. As clinical medicine attracted him rather more than pathology he became physician at St. Mary's Hospital, Plaistow but he continued with forensic pathology in North London.

He wrote many papers in many journals and several books, 'Handbook of diseases of the blood', 'Recent advances in haematology', 'Clinical Atlas of blood diseases' with K. WYARD, and 'Sternal puncture' with J. L. HAMILTON-PARKERSON. Some of them ran to several editions.

Dr PINOY was close friend of PAUL CHEVALLIER, and with him was one of the founders of the European Society of Haematology in 1947. He spoke French and German like a native and Italian and Spanish fairly well, and translated several books into English. He was popular person at the meetings and congresses he attended, was widely read and a most story-teller with a quick and incisive wit. This must have enabled him to face several serious illnesses during the last few years, when he was devotedly looked after by his wife Dorothy and encouraged by his sons.

ALFRED PINOY was fine physician, famous haematologist, polished linguist and attractive personality well rounded, remarkable character. His family and his many friends and colleagues will miss him.

E. NEWMARK, London

Index rerum ad Vol. 34

Bearbeitet von G. BORM, Basel

(B) = Buchbesprechungen - Livres nouveaux - Book reviews

- Absorption (vitamin K) v Hypoprothrombinaemia
- Acquired idiopathic hypoprothrombinaemia v Hypoprothrombinaemia
- Adsorption, v Desorption, Plasmaproteinfilm
- Advances, v Progress
- Agar-gel electrophoresis, Myelomprotine
- Agglutinated erythrocytes, v Widerstand, elektrischer
- Anaemia, COOLEY's anaemia the thalassaemia syndrome (V COOLEY's anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291
- Anaemia, haemolytic, autoimmune case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and LARSEN GUILLAIN-BARRÉ syndrome, 361
- Anaemia, mediterranean, v Thalassemia, β -Thalassemia
- Anaemia perniciosa, v Pernicious-Krankheit
- Antibiotics, Chloramphenicol
- Antibodies, Rh-incompatibility
- Antibodies (autoantibodies) v Thrombocytopenia
- Anticorps, v Antibodies
- Antikörper v Antibodies
- Autoantibodies, v Thrombocytopenia
- Autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and LARSEN-GUILLAIN-BARRÉ syndrome, case, 361
- Autoimmune hämolytische Krankheit, Stoffwechselveränderungen in Erythrocyten, 83
- BARRÉ, v LARSEN
- Beta-thalassemia; cytochemical observations on β -thalassaemia (I. The PAS positive substance of erythroblasts) 1
- Blutintoxikation hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Blutintoxikation, 338 - v Heavy metals
- Blut, radioaktives, v Heavy metals
- Blood coagulation, laboratory methods, 127 (B)
- Blood coagulation, v Haemophilia, Hypoprothrombinaemia, Streptokinase therapy Thrombocytopenia
- Blood groups, v Rh-incompatibility
- Blood transfusion; VIIth congress of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966) 64, 128
- Blood Transfusion, International Society JEAN JULLIARD prize, 570
- Blutplättchen, v Thrombocytopenia, Thrombocytopenie
- Blutvolumen die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zur kontrollierender Erythrocytenmasse bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116
- Body irradiation (partial), v Typhoid vaccines
- Bone marrow human, during the last three months of intruterine life (A histological study) 228
- Bone marrow Chloramphenicol, Erythrin, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
- C¹⁴ v Erythrin
- Calfot, lye, Streptokinase therapy OSTEAL-HYALIN-STROMA-SYNDROME syndrome, four cases, histochemical and genetic studies, 20
- Chloramphenicol and erythropoiesis, 321

- Chromatographie, Papier-Chromatographie, v. Porphyrinsynthese
- Chromom, radioactive, v. Erythrocytenmenge, Osteomyelofibrose
- Chromosome complement in some myeloproliferative disorders, investigations, 35
- Citric acid solution, v. Streptokinase therapy
- Coagulation of blood, v. Haemophilias, Hypoprothrombinemia, Laboratory methods, Streptokinase therapy
- Thrombocytopenia
- Cold-labile proteins, Serumkomponenten
- Conductibility v. Erythrocytes, gap-joints
- Congenital familial methaemoglobinemia, v. Kongenitale Methämoglobinämie
- Congress, XIth, of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966), 64, 128
- Congress, XIIth, of the International Society of Haematology (Sydney 1966) 64, 128
- Cooley's anaemia; the thalassaemia syndromes (V: Cooley's anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291
- Cr⁵¹ v. Erythrocytenmenge, Osteomyelofibrose
- Cryolabiles, proteins cryolabiles, v. Serumkomponenten
- Cyanochemicals, v. Pernicious-Krankheit
- Cytochemical and genetic studies in four cases of COHEN-HIRSHMAN-STRAUSSER syndrome, 20
- Cytochemical observations on β -thalassaemia (L: The PAS positive substance of erythroblasts) 1
- Cytochemistry v. Erythrocyte enzymes, Hämolytische Krankheit, Hämolytische Krise, Phosphatasen, Tetrahydrofolic acid
- Description of some toxic heavy metals from human erythrocytes in vitro, 101
- Diagnostic and therapeutic problems in severe renal failure, 235 (B)
- Diaphorase-mangel; eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorase-mangels, 215
- Diffusoides, v. Mongolien
- Dr. Götzelius syndrome, v. Erythraemic Drepanocytosis; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassaedrepanocytosis, 329
- v. Sickling phenomenon
- Dysproteinaemien Untersuchungen über kälte-labile und wasser-labile Serumkomponenten bei Paraproteinaemien und Dysproteinaemien, 160
- (v. Makroglobulin)
- Elena, v. Haemoglobin, Osteomyelofibrose, Orasen
- Elektrischer Widerstand; die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich, 51
- Electron microscope, v. Erythraemic
- Electrophoresis; agar-gel electrophoresis, Myelomproteins
- Electrophoresis, paper electrophoresis, v. Myelomproteins
- Electrophoresis, starch gel electrophoresis, v. Haemoglobin E, Sickling phenomenon, Thalassaemia
- Embryo (human), v. Bone marrow
- Enfants mort-nés, v. Human bone marrow Rb-incompatibility
- Enzyme system; studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
- Enzymes; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassaedrepanocytosis, 329
- Erythraemic alterations érythroblastiques = érythrocytaires dans la myelose érythémique aigüe, 277
- Erythroblastes alterations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myelose érythémique aigüe, 277
- (the PAS positive substance of erythroblasts (Cytochemical observations on β -thalassaemia L) 1
- Erythroblastische foci, v. Rb-incompatibility
- Erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassaedrepanocytosis, 329
- Erythrocyten Plasmaprocinfilin an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten, 239
- Stoffwechselveränderungen in Erythrocyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit, 65

- ; Untersuchungen über die Häm-synthese in roten Blutzellen. (L: Die Bildung von Fe^{2+} Hämoglobin in Haemo-lysat und Suspensionen aus Kaninchenerythrocyten. Anwendung einer Präzipitationsmethode zur Isolierung des Haemeisens) 193
- Erythrocyten, gepackte die Ursache des elektrischen Widerstandes ge- packter Erythrocyten im niederfre- quenten Bereich, 51
- Erythrocytenkoagel, v. Osteomyelofibrose
- Erythrocytenmenge, zirkulierende; die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und sterbender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116
- Erythrocytes altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myélose érythématisque aiguë, 277
- Erythrocytes, human; description of some toxic heavy metals from human erythrocytes *in vitro* 101
- v. Sickling phenomenon
- Erythroleukaemia, v. Erythremia
- Erythropoiesis and chloramphenicol, 321
- Erythropoiesis, v. Osteomyelofibrose
- Experimental tumor research, progress (Vol. 5; Vol. 6) 233 (B)
- Falciformes, erythrocytes falciformes, v. Drepanocytose, Sickling phenomenon
- Familial chronic thrombocytopenia with platelet autoantibodies, 30
- Familie mit kongenitaler Methylmoglobinämie infolge Diaphorasmangels, 215
- Families with Cerebral-syndromes, Cerebral
- Families, v. Thalassemia
- Fe^{2+} v. Haem-synthese, Osteomyelofibrose
- Fetastruktur v. Erythremia
- For v. Haem-synthese, Osteomyelofibrose, Osmia
- Formants; erythrocyte enzymes in the- lesemia and thalasmodrepanocytosis, 329
- studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
- ; v. Diaphorasmangel, Glukose-6-phosphatdehydrogenase, Hämolytische Krankheit, Haem-synthese, Myo- isoproteine, Phosphatact, Porphyr- idiosynthese
- Ferruklinetik, v. Osteomyelofibrose
- Fetal haemoglobin, v. Thalassemia
- Fibrinogeninact, Auflösung, v. Strepto- kinase therapy
- Film, v. Plasmaproteinfilm
- Fetal haemoglobin, v. Thalassemia
- Fetus (human) v. Bone marrow
- Gamma-globulin therapy substitutive- inhibitory as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
- Gamma-G-globulin; metabolism of γ G- globulin in chronic leukaemia, 44
- Genetic and histochemical studies in four cases of Cerebral Hoarsen-Stre- ptococcus syndrome, 20
- Genetics, Haemoglobin E, Porphyrin- synthese, Sickling phenomenon, Thal- semia, β Thalassemia
- Gesellschaft, v. Society
- Gewerkele dieren (= Ferkel) v. Granulocyten
- Globules rouges, v. Erythrocytes, Ery- throcytes
- Globulin metabolism of γ G-globulin in chronic leukaemia, 44
- Globulin, v. Gamma-globulin therapy
- γ -Globulin, v. Gamma-globulin therapy
- γ G-globulin, v. Gamma-G-globulin
- Globuline, v. Makroglobuline
- Glukose-6-phosphatdehydrogenase; hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Bilexoxidation, 338
- Glykoproteide, v. Myoisoproteine
- Granulocyten; bijdrage tot de kennis van de morfologie van de granulocyten bij de mens en de gewerkele dieren (Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der Granulocyten beim Menschen und bei den Wirbellosen), 230 (B)
- Granulocytes, neutrophil (normal gran- ulation) v. Cerebral
- Gruene, v. Human bone marrow
- Quarternische Porphyrin congenita, Säu- rung der Porphyrinsynthese, 63
- GUILLAIN, v. LANDRY

- Hæmatology: Xth congress of the International Society of Hæmatology (Sydney 1966), 64, 128
- Hæmatology of some South African Republics, 250 (B)
- Hæmatokrit, v Erythrocytes, gepackts
- Hæmoglobin, v Methämoglobinämie
- Hæmoglobin (Fe²⁺-Hämoglobin) v Hæmerythrin
- Hæmoglobin E: further example of thalassaemia - hæmoglobin E disease in Turkey 354
- Hæmoglobin, fetal, v Thalassaemia
- Hæmoglobin S; the sickling phenomenon in white male without Hb-S 347
- Hæmoglobinopathy v β -Thalassaemia
- Hæmolytic anaemia, autoimmune; cause of autoimmune hæmolytic anaemia, thrombocytopenia and LAMBERT-GEZELLE-BLAIK syndrome, 361
- Hæmolytische Krankheit, autoimmune: Suftwädelverhållanden in Erythrocyten, 88
- Hæmolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Biotinidation, 358
- Hæmophilie (International symposium) 127 (B)
- Hæmorrhagic diathesis, v Hypoprothrombinæmia
- Hæmorrhagy v Thrombocytopenia
- Hæmerythrin in rosen Blærfællen, Untersuchungen (I. Die Bildung von Fe²⁺-Hämoglobin in Hæmerythrin und Suspendieren aus Kæmischwerthælozyten. Anwendung einer Präzipitationsmethode zur Isolierung des Hæmerythrin), 193
- 1: Porphyrinsynthese
- Hb-S: the sickling phenomenon in white male without Hb-S, 347
- Hb E; a further example of thalassaemia-hæmoglobin E disease in Turkey 354
- Heavy metals, toxic, description from human erythrocytes *in vivo*, 101
- Hématie, v Erythrocytes, Erythrocytes
- Hæmolyse per autoimmunisation, v Hæmolytische Krankheit
- Hæmophilie (International symposium) 127 (B)
- Hæredopathy v Cædæx: Hæmoglobin E, Methämoglobinämie, Porphyria congenita, Sickling phenomenon, Thalassaemia, β -Thalassaemia, Thrombocytopenia
- Hg²⁺ v Heavy metals
- Hidæmæ - v Cædæx
- Histochemistry v Cædæx: Erythrocyte enzymes, Hæmolytische Krankheit, Hæmolytische Krise, Phosphatase, Tetrahydrofolic acid, β Thalassaemia
- Honæst, v Grænozytes
- Human bone marrow during the last three months of intravital life (A histological study) 228
- Human erythrocytes, Erythrocytes, human
- Human leukocytes, v Grænozytes Leukozytes, human
- Hydrolysis, proteins hydrolysis, v Serumproteins
- Hypoprothrombinæmia, acquired, idiopathic (Acquired hypoprothrombinæmia secondary to selective deficient absorption of vitamin K), 187
- Idiopathic acquired hypoprothrombinæmia, v Hypoprothrombinæmia
- Immune tolerance, disorders, Autoimmune hæmolytic anaemia
- Immunitæper v Autoimmune hæmolytische Krankheit
- International Society of Blood Transfusion, Xth congress (Sydney 1966), 64, 128
- i: JEAN JULIARD prize, 570
- International Society of Hæmatology: Xth congress (Sydney 1966) 64, 128
- Isonitration, Biotinidation, Heavy metals
- Intravital life: human bone marrow during the last three months of intravital life (A histological study), 228
- Iron, Hæmerythrin, Osteomyeloblastose
- Iron deficiency; onæmia, manifestation of iron deficiency 127 (B)
- Irradiation; the effect of typhoid vaccine injection of partial body irradiated rats, 301
- Isonæmæ, Porphyrinsynthese

- Isotope, radioaktive, v Erythrämie, Erythrocytenmenge, Hämsynthese, Heavy metals, Osteomyelofibrose
- JULLIARD, JEAN, prize, 370
- Käsekläufige Serumkomponenten, v Serumkomponenten
- Kidney v Renal failure
- Knochenmark, v Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
- Kongenitale Methämoglobinämie, familiäre infolge Diaphorasenmangel, 215
- Kongenitale Porphyrie (Görtsches) v Porphyriasynthese
- Kongress, v Congress
- Labilitätsphänomene, v Serumkomponenten
- Laboratory methods in blood coagulation, 127 (B)
- LAXERT-GULLAND-BARREL syndrome case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and LAXERT-GULLAND-BARREL syndrome, 361
- Lead poisoning, v Bichromatization
- Lead, radioactive, poisoning, v Heavy metals
- Leitfähigkeit gepackter Erythrocyten, v Widerstand, elektrischer
- Leukæmia, chronic, metabolism of γ G-globulin, 44
- Leukæmia, v Myeloproliferative disorders
- Leukæmic and normal leukocytes, v Leukocytes, human, normal and leukæmic
- Leukocytes, Granulocytes
- Leukocytes les phosphates leucocytaires alcalines et acides Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphates plasmatiques, 129
- Leukocytes, human, normal and leukæmic studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
- Leukopenia (after partial body irradiation) v Typhoid vaccine
- Libri, 127 250-255
- Lymphocytes, v Cancer
- Makroglobulin und Myelomproteine, Charakterisierung, 144
- v Paraproteinklinen
- Man, v Granulocytes, Human bone marrow
- Mediterranean anaemia, v Thalassemia, β -Thalassemia
- Medula ossea, v Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
- Megaloblastäre Anämie, v Perniköse-Kranke
- Membran der Erythrocyten, v Erythrocyten, gepackte; Heavy metals
- Mens (= Mensch), v Granulocytes
- Mensch, v Granulocytes
- Mercury radioactive, v Heavy metals
- Metabolism of γ G-globulin in chronic leukæmia, 44
- Metabolismus, v Stoffwechselvorgänge
- Metals, heavy toxic, v Heavy metals
- Methämoglobinämie, kongenitale familiäre, infolge Diaphorasenmangel, 215
- Methode, v Hämsynthese, Plasmodien
- Methods laboratory methods in blood coagulation, 127 (B)
- Microscope électronique, v Erythrämie
- Mischbildungen, v Mongoose
- Mixos, v Chloramphenicol, Erythrämie
- Mocle osseus, Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
- Mongoose étude clinique de 134 manges, 127 (B)
- Mort étale, v Human bone marrow Rh-incompatibility
- Myelomproteine und Makroglobuline, Charakterisierung, 144
- v Paraproteinklinen
- Myeloproliferative disorders investigations on the chromosome complement in some myeloproliferative disorders, 36
- Myelose erythémiques altérations érythroblastiques érythrocytaires dans la myelose erythémique aiguë, 277
- Necrologia, 370
- Neugeborene, v Human bone marrow
- Neutrophil granulocytes, CIRCULAR ..
- New-born, Human bone marrow
- Niederfrequenter Bereich, v Erythrocyten, gepackte
- Niere, v Renal failure

- Kernoblast, v Erythroblast
 Knochenspt., Human bone marrow
 Oberfläche menschlicher Erythrocyten,
 Plasmaproteinfilm, 239
 Erythrocyten, gepackte Heavy
 metals
 Osteoclasts, Human bone marrow
 Outez Vaguez, morbus Polycy-
 thaemia vera
 Osteomyelofibrose (Untersuchung der
 Ferro- und Erythrocytenkonzentration mit
 radioaktivem Eisen und Chrom) 257
 Oseum, manifestation of iron defi-
 ciency 117 (B)
 Paper electrophoresis, v Myelompro-
 teides
 Paraproteinemien; Untersuchungen
 über katalytische und wasserlösliche Se-
 rumkomponenten bei Paraprotein-
 emien und Dysproteinemien, 160
 v Makroglobulinen
 PAS positive substances in erythroblasts
 (Cytocchemical observations on β -thal-
 aemia I) 1
 Pb, v Bleimodifikation
 Pb^{2+} Heavy metals
 Periodic acid Schiff (= PAS) reaction,
 PAS positive substances
 Pernicious Krimle, Untersuchung der
 Thrombocytopoese, 175
 Phosphates leucocytes alkaline et
 acides: Variations pathologiques, ré-
 gulation humorale et rapports avec
 les phosphates plasmatiques, 129
 POPE ALBERT (1896-1963) 571
 Plaques sanguines, v Thrombocyto-
 penia, Thrombocytopoese
 Plasma, les phosphates leucocytes
 alkaline et acides: Variations patho-
 logiques, régulation humorale et rap-
 ports avec les phosphates plasmati-
 ques, 129
 Plasmaproteinfilm an der Oberfläche
 menschlicher Erythrocyten, 239
 Plasminogen; technique for routine
 evaluation of plasminogen in humans
 during streptokinase therapy 305
 Plasmocytoma, Myeloproliferative
 disorders
 Plättchen, Thrombocytopenia, Throm-
 bocytopoese
 Plomb, intercalation, Bleimodifikation
 Plomb, radioactive, intercalation, v
 Heavy metals
 Polycythemia vera; die Indikation zur
 Bestimmung von Blutvolumen und
 zirkulierender Erythrocytenmenge bei
 Polycythemia vera und Polyglobu-
 lien, 116
 Polyglobulien; die Indikation zur Be-
 stimmung von Blutvolumen und zir-
 kulierender Erythrocytenmenge bei
 Polycythemia vera und Polyglobu-
 lien, 116
 Porphyria congenita (Günther) Stö-
 rung der Porphyrinsynthese bei der
 Günther'schen Porphyria congenita,
 65
 Porphyrinsynthese, Störung bei der Gün-
 ther'schen Porphyria congenita, 65
 Pregnancy v Human bone marrow
 Principialemethode (Münch) v
 Haemaphysosom
 Prize; JEAN JULLIARD prize, 370
 Program in experimental tumor research
 (Vol. 5 Vol. 6) 255 (B)
 Proctofilm; Plasmaproteinfilm an der
 Oberfläche menschlicher Erythro-
 cyten, 239
 Protein, Globulin, Myelomprotein,
 Serumkomponenten
 Prothrombin, v Hypoprothrombin-
 aemia
 Purpura, thrombocytopenic, idiopathic,
 (benign), v Thrombocytopenia
 Quecksilber radioaktiv, v Heavy
 metals
 Radikant, v Typhoid vaccine
 Radio-Blei (Radio-Quecksilber Radio-
 Thallium), v Heavy metals
 Radiocarbon, v Erythritol
 Radiochrom, v Erythrocytenmenge,
 Osteomyelofibrose
 Radiochrom, v Haemaphysosom,
 Osteomyelofibrose
 Radio-Quecksilber Heavy metals
 Radio-Thallium, v Heavy metals
 Rat, Typhoid vaccine
 Rayon X, v Typhoid vaccine
 Red cells, v Erythrocyten, Erythro-
 cytes
 Rein, v Renal failure

- Renal failure therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure, 235 (B)
- Reptiles haematology of some South African reptiles, 250 (B)
- Resistance électrique, v. Widerstand, elektrischer
- Resorption (Vitamin K), v. Hypoprothrombinaemia
- Reticulocytes (Kernchenretikulozyten) v. Haemopoiesis
- Rh-incompatibility: substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
- Rheogrammatodes, orblich-kontinuierliche, v. OERDMAT
- Röntgenstrahlen, v. Typhoid vaccine
- Schwangerschaft, Human bone marrow
- Schwermetalle, toxische, v. Heavy metals
- Serumkomponenten Untersuchungen über kältelabile und wasserlabile Serumkomponenten bei Paraproteidämien und Dysproteidämien, 160
- ; v. Makroglobulin
- Sickling phenomenon in white male without Hb-S, 347
- Drepanozytose
- Society: XIth congress of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966), 64
- International, of Blood Transfusion, v. JEAN J. LELEUP prize
- ; XIth congress of the International Society of Haematology (Sydney 1966), 64
- South Africa haematology of some South African reptiles, 250 (B)
- South gel electrophoresis, v. Haemoglobin E, Sickling phenomena, Thalassemia
- Statistische Auswertung, v. Chloramphenicol, Erythrocyte count, Erythrocytenumenge, Hämolytische Krankheit, Human bone marrow Phosphatase
- Strömungskörper v. OERDMAT
- Stillbirth substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
- Thrombocytopenia; a case of autoimmune haemolytic anaemia, throm-
- Thrombosen children, v. Human bone marrow
- Stoffwechsel, v. Metabolism
- Stoffwechselstörungen in Erythrocyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit, 88
- Strahlenwirkung, v. Typhoid vaccine
- Streptokinase therapy: technique for routine evaluation of plasminogen in humans during streptokinase therapy 305
- Subdermoepithelial structure, v. Erythema
- Surface of erythrocytes, v. Erythrocytes, gepackte Heavy metal Phosphatase
- Symposium, v. Haemophiles
- Syndrom des Porphyrins, v. Porphyrinurie
- Technique for routine evaluation of plasminogen in humans during streptokinase therapy 305
- Teratologie, v. Malignancy
- Tetrahydrofolic acid studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 77
- Thalassemia; erythrocyte enzymes in thalassemia and thalassaemio-cytosis, 329
- β -Thalassemia; cytochemical observations on β -thalassaemia (I: The PAS positive substance of erythroblasts), 1
- Thalassaemia-haemoglobin E disease in Turkey a further example, 254
- Thalassaemia syndromes (V. Cooley) anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291
- Thalassaemio-cytosis, v. Thalassemia
- Thallium, radioactive v. Heavy metals
- Therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure, 235 (B)
- Therapy streptokinase therapy: technique for routine evaluation of plasminogen during streptokinase therapy 305
- ; substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
- Thrombocytopenia; a case of autoimmune haemolytic anaemia, throm-

- bocytopenia and LANDRY GILLAIN-BARRÉ syndrome, 361
 Thrombocytopenia, familial, chronic, with platelet autoantibodies, 30
 Thrombocytopenia bei Perniciosa-Krankheit, Untersuchung, 175
 Thrombus, Auflösung, v. Streptokinase therapy
 Tl^{203} v. Heavy metals
 Totgeburt, v. Human bone marrow Rh-incompatibility
 Toxic heavy metals, v. Heavy metals
 Transfusion, v. Blood transfusion
 Tumor research, experimental, progress, (Vol. 5, Vol. 6), 255 (B)
 Turkey—further example of thalassemia-hemoglobin E disease in Turkey 354
 Typhoid vaccine injection, effect of partial body irradiated rats, 301
 Ultrastructure, v. Erythremia
 Vaccine; effect of typhoid vaccine injection of partial body irradiated rats, 301
 VAGUEZ, v. OHLER
 Varicella, 64, 127-370
 Vertebrates, v. Granulocytes
 Vitamin B₁₂, Perniciosa-Krankheit
 Vitamin K₁ acquired idiopathic hypoprothrombinemia (Acquired hypoprothrombinemia secondary to selective deficient absorption of vitamin K) 187
 WALDENSTRÖM, morbus- v. Makroglobulin, Paraproteidämien
 Wasserlösliche Serumkomponenten, Serumkomponenten
 Wasserlösliche Proteine, v. Serumkomponenten
 White male without Hb-S, sickling phenomenon, 347
 Widerstand, elektrischer—die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich, 51
 Wirbeltiere, v. Granulocytes
 X-rays, v. Typhoid vaccine
 Zeitschrift, v. Erythrocyten, gepackte

Index autorum ad Vol. 34

(B) — Buchbesprechungen — Livres nouveaux — Book reviews

- Adler H., v. Sedán, N.
 Aksoy M., and Erdem, S., 291
 Ala, P. A., and Shearman, D. J. C., 361
 Alwall, N., 255 (B)
 Anderson, St. B., 44
 Antonoff, J. A., Beer A., et Vannotti A., 129
 Aronow, A., v. Okcuoglu, A.
 Backman, F. Frick, P. G.
 Beer A., v. Antonoff, J. A.
 Barbier F. 250 (B)
 Bell, F. Melchior, J. and Calera, G., 329
 Bell, W. N., Thompson, R. B.
 Bernat, L., 127 (B)
 Bicanová, J. Brabec, V.
 Brabec, V. Bicanová, J. Friedmann, B., Kaut, M., Mitrčková, L., Palek, J. Vaparov, M., and Volck, V. 68
 Brinkman, K. M. (Editor), 127 (B)
 Bronson H. E., 257
 Burgess, W. v. Kleins, N.
 Buscardi, L., Istrosi, P.
 Calera, G., Belloni, P.
 Carrara, P. M., v. Ford, G. B.
 Cataldo, F. de, v. de Cataldo, F.
 Clotson, R., v. Hellmeyer L.
 Clotson, R., Hellmeyer, H.
 Colonna, A., Grignani, F.
 Gerbasi, I. Rák, K.
 de Cataldo, F. 187
 de Villiers Pinaar U. 250 (B)
 de Vreker R. A., 305
 de Wolff, E., Wolff, E. de
 Efendi, P. Sedán, N.
 Elcheffberger J. W. Jr. 127 (B)
 Emery J. L., Kalpaktsoglou, Pina K.
 Erdem, S., Aksoy M.

- Eridani, S., v. Ponti, G. B.
 Fosse, Ph., and Pappayannopoulos, Thalia, 1
 Frick, P. 127 (B)
 Frick, P. G., Bachmann, F. und Schmid, J. R., 215
 Friedmann, B. v. Bräber, V.
 Gannon, A., und Rhombert, F. 338
 Gloor, F., 233 (B)
 Götz, H., v. Scheiffarth, F.
 Gorini, P. v. Rondanelli, E. G.
 Gramlich, F. v. Müller, H. E.
 Grignani, F., Martelli, M., Tonato, M., and Cokema, A., 72
 Harms, D. and Sachs, V. 30
 Heilmeyer, L., und Clotten, R., 65
 Heilmeyer, L., Heimpel, H.
 Heimpel, H., Clotten, R., und Heilmeyer, L., 193
 Hochman, A., Robinson, E.
 Homburger, F. (Editor) 255 (B)
 Huber, H., Lewis, S. M., und Smar, L., 116
 Intruzi, P., Bucarini, L., et Notario, Antonia, 277
 Kalpakoglou, Pina K., and Emery, J. L., 228
 Kleine, N. und Borgas, W. 51
 Klemm, D. v. Schuboth, H.
 Kout, M., Bräber, V.
 Kruse, F., Rák, K.
 Lewis, S. M., Huber, H.
 Lutz, H., Scheiffarth, F.
 Magfink, E., Rondanelli, E. G.
 Martelli, M., Grignani, F.
 Melikoni, J., Belfiore, F.
 Mennich, Virginia, Okçoglu, A.
 Milčević, L., v. Bräber, V.
 Müller, H. E. und Gramlich, F. 239
 Neumark, E., 371
 Notario, Antonia, Intruzi, P.
 Odom, J., Thompson, R. B.
 Okçoglu, A., Mennich, Virginia, and Arcusoy, A., 354
 Palck, J. v. Bräber, V.
 Pappayannopoulos, Thalia, Fosse, Ph.
 Pinaar U de Villers, de Villers Pinaar U.
 Ponti, G. B., Valentini, R., Carrara, P. M., and Eridani, S., 36
 Raju, S., v. Schuboth, H.
 Rák, K., Kruse, F., Varga, L., und Cserháti, L., 175
 Rau, P. J. v. Thompson, R. B.
 Rowald, E., and Suringar, F. 208
 Rhombert, F. v. Gannon, A.
 Robinson, E., and Hochman, A., 301
 Rondanelli, E. G., Gorini, P. and Magfink, E., 321
 Rosenow, G., 127 (B)
 Rosenstajn, L., v. Sadek, N.
 Sachs, V. v. Harms, D.
 Sadek, N., Yaffe, D., Rosenstajn, L., Adler, H., Soroker, B., and Efrati, P. 20
 Scheiffarth, F., Götz, H., und Lutz, H. 144
 Schmid, J. R., Frick, P. G.
 Schuboth, H., Raju, S., und Klemm, D. 160
 Shearman, D. J. C., v. Ala, F. A.
 Soroker, B., Sadek, N.
 Skaller, G. 127 (B)
 Suringar, F. v. Rowald, E.
 Smar, L., v. Huber, H.
 Thelen, H., 235 (B)
 Thompson, R. B., Rau, P. J., Odom, J., and Bell, W. N. 347
 Tonato, M., v. Grignani, F.
 Undritz, E., 250 (B)
 Valentini, R., v. Ponti, G. B.
 Vannotti, A., v. Antonelli, J. A.
 Varga, L., v. Rák, K.
 Villers Pinaar U de, de Villers Pinaar U.
 Volek, V., Bräber, V.
 Vopatová, M., Bräber, V.
 Vreker, R. A. de, v. de Vreker, R. A.
 Witzel, H., 101
 Wolff, Emmanuelle de, 127 (B)
 Yaffe, D., Sadek, N.

